

Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der mechanischen Dehnung von pulmonalen Strukturzellen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Franziska Maser, geb. am 02.12.1982 in Quedlinburg

angefertigt in:

Medizinische Klinik und Poliklinik I, Abteilung für Pneumologie, Universitätsklinikum
Leipzig

Betreuer:

Prof. Dr. med. H. Wirtz

Dr. rer. nat. H. Kuhn

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 25.05.2010

Bibliographische Beschreibung:

Maser, Franziska

Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der mechanischen Dehnung von pulmonalen Strukturzellen

Universität Leipzig, Dissertation

103 S., 191 Lit., 16 Abb.

Referat:

In der vorliegenden Arbeit wird der Hypothese nachgegangen, ob der Transkriptionsfaktor NF- κ B bei der mechanischen Dehnung von pulmonalen Strukturzellen und dem daraus resultierenden inflammatorischen Verhalten dieser verändert exprimiert wird und in wie weit ein Zusammenhang zwischen Dehnung, Zellschädigung und NF- κ B besteht.

Dafür wurden sowohl frisch isolierte alveoläre Ratten-Typ-II Zellen, Zellen der human-alveolaren Epithelzelllinie A549 sowie Lungen- Fibroblasten der Zell-Linie Wi 38 untersucht.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Der Transkriptionsfaktor NF - κ B	4
1.1.1	Kurze Einführung	4
1.1.2	Struktur der NF- κ B und I κ B - Proteine	4
1.1.3	Die Aktivierung des NF – κ B-Systems durch den I κ B- Kinasekomplex (IKK)	7
1.1.4	Die Bedeutung von NF- κ B in der Entzündungsreaktion	13
1.2	Akutes Lungenversagen / ARDS	16
1.2.1	Definition und Epidemiologie	16
1.2.2	Pathogenese	17
1.2.3	Klinik	18
1.2.4	Therapie	19
1.3	Beatmung und beatmungsinduzierte Lungenschädigung	20
1.3.1	Das Alveolarsystem der Lunge	20
1.3.2	Effekte von mechanischer Dehnung auf die Alveolarepithelzellen	21
1.3.3	Darstellung verschiedener experimenteller Dehnungsmechanismen	24
1.3.3.1	Tiermodell	24
1.3.3.2	Isoliertes Organ	25
1.3.3.3	Zelluläres Modell (Zell stretch in vitro)	27
1.3.4	Ventilatorinduziertes Lungenversagen / VILI	29
1.4	Aufgabenstellung	31
2	Fragestellung	32
3	Material und Methoden	34
3.1	Material	34
3.1.1	Lösungen und Puffer	34
3.1.2	Kulturmedien	36
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien	37

3.1.4	Zellkulturmaterial	38
3.1.5	Geräte	39
3.1.6	Kommerzielle Assay`s	40
3.1.7	Zellen	40
3.2	Methoden	41
3.2.1	Vorbereitende Maßnahmen	
3.2.1.1	Isolierung der alveolären Typ II – Zellen	41
3.2.1.1.1	Versuchstiere	41
3.2.1.1.2	Narkose	41
3.2.1.1.3	Präparation der Lunge	41
3.2.1.1.4	Zellisolierung der Alveolarepithelzellen	42
	Typ II	
3.2.1.2	Zellkultivierung der A 549- und Wi 38 – Zellen	43
3.2.1.3	Mechanische Dehnung der Zellen in der Dehnma- schine	44
3.2.1.4	Aufarbeitung der Proben	46
3.2.1.5	Herstellung der zytosolischen und nukleären Ex- trakte	46
3.2.2	LDH – Bestimmung (Kit von Roche)	47
3.2.3	Proteinbestimmung (nach Pierce)	47
3.2.4	NF-κB Bestimmung mittels ELISA	48
4	Ergebnisse	50
4.1	Nachweis der nukleären Lysate	50
4.2	Laktatdehydrogenase	50
4.2.1	Physiologische Stimulation der AT II-, A549- und Wi 38 - Zellen	50
4.2.2	Pathologische Stimulation der AT II-, A549- und Wi 38 - Zel- len	52
4.3	Transkriptionsfaktor NF-κB	54
4.3.1	Expression in den cytosolischen Extrakten der AT II-, A549- und Wi 38 - Zellen	54
4.3.2	Expression in den nukleären Extrakten der AT II-, A549- und	58

Wi 38 - Zellen		
4.4	Kinetik der NF- κ B – Expression bei AT II-, A549- und Wi 38 - Zellen	62
4.4.1	Alveoläre Typ – II - Zellen	62
4.4.2	A 549 - Zellen	64
4.4.3	Fibroblasten (Wi 38 – Zellen)	66
4.5	Vergleiche zwischen den unterschiedlichen Zellen	68
4.6	statistische Auswertung	69
5	Diskussion	70
5.1	NF- κ B Aktivierung in pulmonalen Strukturzellen bei mechanischer Belastung	70
5.2	Effekte von physikalischem Stress in pulmonalen Strukturzellen	72
5.3.	Zukünftige Studien	77
6	Zusammenfassung	79
7	Literaturverzeichnis	81
8	Abkürzungsverzeichnis	96
9	Abbildungsverzeichnis	98
10	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	100
11	Danksagung	101
12	Lebenslauf	102

1 Einleitung

1.1 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

1.1.1 Kurze Einführung

Nuclear factor- κ B (NF- κ B) wurde 1986 von Sen und Baltimore als ein Protein in reifen B-Lymphozyten entdeckt, das an eine spezifische DNA-Sequenz in einer Enhancerregion des κ -Ketten-Gens der Immunglobuline bindet und dadurch dessen Transkription stimuliert (Biochemie-Buch, Uni med Verlag; Liou und Baltimore 1993; Sen und Packer 1996; Sen und Baltimore 1986a+b). Weitere Forschungen ergaben, dass er nicht nur in immunologisch kompetenten Zellen vorkommt, sondern ubiquitär im gesamten Organismus zu finden ist und durch verschiedene Stimuli freigesetzt werden kann (Baeuerle und Henkel 1994). Der Faktor spielt eine bedeutende Rolle als Regulator bei der Expression von Genen, die grundlegende Funktionen im Entzündungsgeschehen, bei der Apoptose, der Immunantwort und der Zellproliferation haben. So ist er unter anderem an der Transkription zahlreicher Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8 und TNF α als auch den mitogeninduzierten Enzymen Cox-2 und iNOS bis hin zu Granulozyten / Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) beteiligt (Baldwin 2001; Baeuerle und Baltimore 1996; Newton et al. 1997; Chen et al. 2001; Blackwell und Christman 1997; Tak und Firestein 2001; Barkett und Gilmore 1999). NF- κ B ist in den meisten Zellen im Zytoplasma zu finden, wo er durch Bindung an inhibitorische I κ B-Proteine in einem inaktiven Zustand gehalten wird. Antikörperproduzierende B-Zellen, aktivierte T-Zellen und Makrophagen stellen die Ausnahme dar, in denen der Transkriptionsfaktor konstitutiv im Zellkern vorhanden ist (Biochemie-Buch, Uni med Verlag; Sen und Baltimore 1986b; Baeuerle und Baltimore 1988a+b).

1.1.2 Struktur der NF- κ B und I κ B – Proteine

NF- κ B ist ein dimerer Transkriptionsfaktor mit Untereinheiten bestehend aus Proteinen der Rel – Familie. Diese bilden miteinander Homo- oder Heterodimere. Am häufigsten wurde bisher der NF- κ B- Komplex mit den Untereinheiten p50 und p65 (RelA)

identifiziert (Baeuerle und Baltimore 1996; May und Ghosh 1997; Thanos und Maniatis 1995). Insgesamt gehören fünf Mitglieder der NF- κ B/ Rel- Familie an: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p100/p52 und p105/p50 (Baldwin 1996; Baeuerle und Baltimore 1996; Grilli et al. 1993; Whiteside und Israel 1997). Allen Mitgliedern der NF- κ B/ Rel- Familie ist die Bindung an DNA möglich, aber nur p65 (RelA), RelB, und c-Rel sind in der Lage, sich an DNA-Regionen zu binden, welche zur Aktivierung von Transkriptionsprozessen notwendig sind (Phelps et al. 2000a; Christman et al. 2000; Lawrence et al. 2001). Die so genannte Rel – Homology - Domain (RHD), bestehend aus ca. 300 Aminosäuren, ist in allen Untereinheiten zu finden. Ihre Bestandteile sind für die Dimerisierung (Dimerisierungsdomäne, DD), DNA-Bindung (Helix-Loop-Helix-Motiv, HLH) und nukleäre Translokation („nuclear localization sequence“, NLS) verantwortlich (May und Ghosh 1997; Phelps et al. 2000b; Siebenlist et al. 1994; Baldwin 1996). Zur Komplexbildung mit den inhibitorischen I κ B-Proteinen werden die NLS und zusätzlich eine C- terminal zur NLS gelegene Region der RHD benötigt. Außerdem besitzen einige Untereinheiten wie z.B. p65 einen N- terminalen Anteil in ihrer RHD, die NF κ B/Rel/dorsal – NRD- Domäne, die ebenso für die Interaktion mit den I κ B-Proteinen verantwortlich ist (Phelps et al. 2000b; Baeuerle und Henkel 1994).

Im Cytoplasma liegt NF- κ B gebunden an die inhibitorische Untereinheit, I κ B, vor (Simeonidis et al. 1999). Zu den I κ B- Proteinen gehören I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3 sowie die Vorläuferproteine p105 und p100. Sie sind gekennzeichnet durch sechs bis sieben Ankyrin- Wiederholungen, den so genannten ARD – „ankyrin repeat domain“. Durch die Bindung der I κ B-Proteine an NF- κ B im Cytoplasma wird die Kernlokalisierungssequenz (NLS) der Rel- Proteine verdeckt und der Transkriptionsfaktor inaktiviert bzw. in einem inaktiven Zustand gehalten. Für die Hemmung von NF- κ B sind vor allem I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ wichtig, die mit dem NF- κ B- Dimer einen tertiären Komplex ausbilden. Sie besitzen eine N- terminale Domäne, über die der Abbau der I κ B- Proteine durch das 26S- Proteasom reguliert wird, nachdem NF- κ B aktivierende Stimuli auf den Komplex eingewirkt haben. Dies hat die Freisetzung, die Translokation in den Zellkern und damit die Aktivierung von NF- κ B zur Folge (Baldwin 1996; Karin und Ben-Neriah 2000; Chen et al. 1999; Phelps et al. 2000a; Beg und Baldwin 1993; Gosh und Baltimore 1990; Baeuerle und Baltimore 1996; Siebenlist et al. 1994; Thanos und Maniatis 1995; Thompson et al. 1995; Whiteside et al. 1997; May und Gosh 1997). Die I κ B- Proteine enthalten zusätzlich eine C- terminale Sequenz, in der

sich Prolin, Glutamat, Serin und Threonin befinden (Tran et al. 1997). Diese PEST – Sequenz ist unerlässlich für die schnelle Degradation der I κ B – Moleküle bei der Aktivierung von NF- κ B (Naumann und Scheidereit 1994).

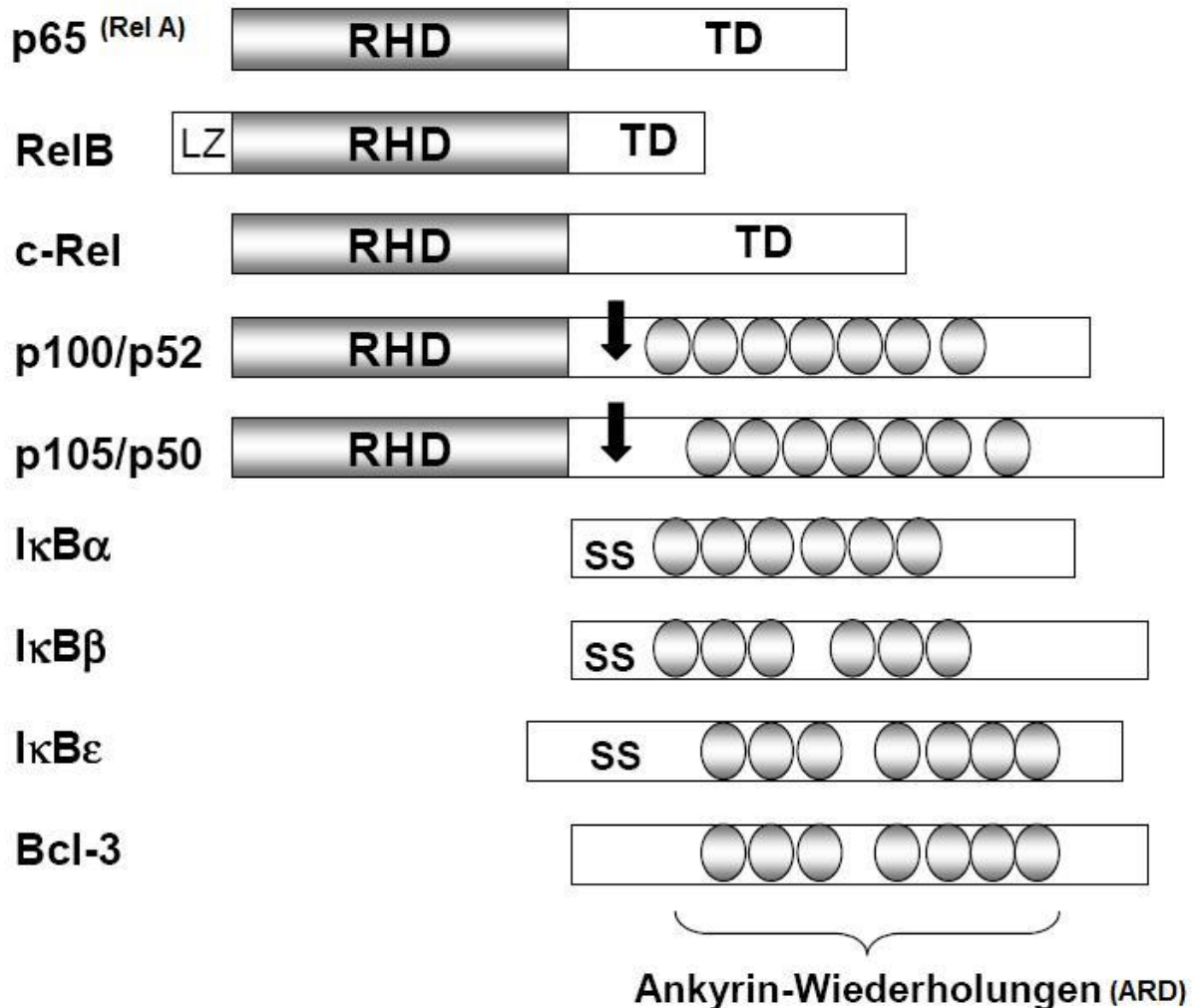


Abb.1: NF- κ B/Rel- und I κ B-Proteine (verändert nach Karin und Ben-Neriah, 2000). LZ: Leucin-Zipper, RHD: Rel-Homologiedomäne, TD: Transaktivierungsdomäne, SS: SS steht für die beiden Serine in der N-terminalen Region von I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ , die durch den I κ B-Kinasekomplex (IKK) phosphoryliert werden. P50 und p52 entstehen aus ihren Vorläuferproteinen p105 und p100 durch limitierte Proteolyse durch das 26S-Proteasom. Die Schnittstellen sind schematisch durch einen schwarzen Pfeil markiert. Nicht dargestellt ist I κ B γ , das der C-terminalen Domäne von p105 entspricht.

I κ B α ist das am besten charakterisierte inhibitorische Protein (Karin und Ben-Neriah 2000; Gosh und Baltimore 1990; Zabel und Baeuerle 1990; Davis et al. 1991; Haskill et al. 1991). Es wird im Organismus ubiquitär exprimiert und bindet bevorzugt an die p65 oder c-Rel Untereinheit von NF- κ B (Baldwin 1996; Gosh et al. 1998). Alle bekannten Signale, die NF- κ B aktivieren können, führen über den Abbau von I κ B α zu einer transienten / vorübergehenden Aktivierung des Transkriptionsfaktors (Sun et al. 1993). I κ B β wird im Gegensatz dazu nur nach Stimulation mit LPS und IL- 1 abgebaut, was zu einer persistierenden Aktivierung des Transkriptionsfaktors führt (Suyang et al. 1996).

1.1.3 Die Aktivierung des NF- κ B-Systems durch den I κ B- Kinasekomplex (IKK)

Eine große Zahl verschiedenster Stimuli vermag das NF- κ B-System zu aktivieren (Baeuerle und Baltimore 1996; Baldwin 1996). Dazu gehören unter anderem Cytokine wie TNF α und IL-1, Wachstumsfaktoren, Hormone, LPS, Viren (HTLV-1), virale Produkte, oxidative oder umweltbedingte Stressfaktoren (z.B. Schwermetalle, Zigarettenrauch) sowie Chemotherapeutika (Pahl 1999; Baldwin 1996; Grilli et al. 1993; Page et al. 1999; Siebenlist et al. 1994; Brand et al. 1997).

Die Phosphorylierung, die zur NF- κ B Aktivierung führt, wird durch den I κ B- Kinasekomplex (IKK) katalysiert, der als Hauptregulator eine entscheidende Funktion in der Signalkaskade spielt (DiDonato et al. 1997; Mercurio et al. 1997; Zandi et al. 1997). An diesem Komplex konvergieren die meisten der durch differente Stimuli ausgelösten Signaltransduktionswege. Er phosphoryliert die I κ B- Proteine an spezifischen Serinresten. Das dient als Signal für eine nachfolgende Polyubiquitierung und den anschließenden Abbau der I κ B- Proteine durch das 26S- Proteasom. Dadurch wird NF- κ B aktiviert und freigesetzt. Das so entstandene NF- κ B- Dimer transloziert nun in den Zellkern, wo es an regulatorische κ B- Promotor- und Enhancer- Elemente bindet und in Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren die spezifische Expression zahlreicher Gene steuert (Baldwin 1996; Karin und Ben-Neriah 2000; Baeuerle und Baltimore 1996; Baeuerle und Henkel 1994; May und Gosh 1997). Der Mechanismus ist am besten erforscht für I κ B α . An den Serinresten 32 und 36 in der N- terminalen, regulatorischen Domäne phosphoryliert der IKK- Komplex I κ B α (Brown et al. 1995). Dies dient als Erkennungsmotiv für den SCF/ β -TrCP Ubiquitin- Ligase- Komplex (Yaron

et al. 1998) und hat die Polyubiquitinierung der Lysinreste 21 und 22 zur Folge (Scherer et al. 1995). Nun wird das I κ B α durch das 26S- Proteasom abgebaut. Über den selben Mechanismus erfolgt die Aktivierung von NF- κ B in Komplexen mit I κ B β und I κ B ϵ , die ebenfalls Serin- und Lysinreste in ihrer N- terminalen Domäne besitzen (May und Gosh 1998).

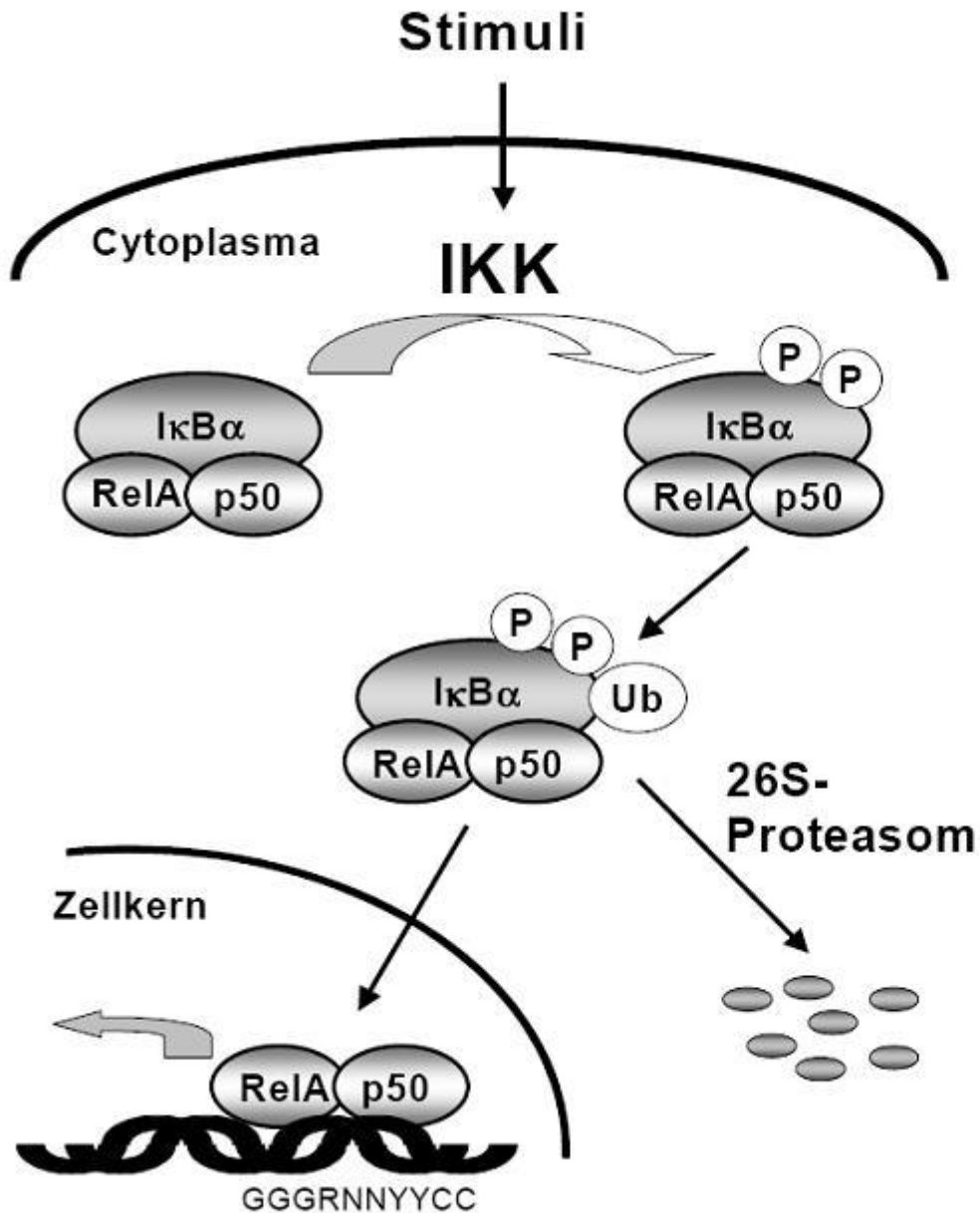


Abb. 2: Allgemeiner Aktivierungsmechanismus von NF-κB. Beispielhaft ist die Aktivierung eines p65 (RelA)/p50-Heterodimers in Komplex mit IκBα dargestellt. Fast alle NF-κB aktivierenden Stimuli aktivieren den IκB-Kinasekomplex (IKK). Dieser phosphoryliert IκBα an den Serinresten 32 und 36, was als Signal für eine nachfolgende Polyubiquitinierung von IκBα durch die SCF/β-TrCP Ubiquitin-Ligase an den Lysinresten 21 und 22 dient. Polyubiquitiniertes IκBα wird durch das 26S-Proteasom degradiert und das freigesetzte NF-κB transloziert in den Zellkern, wo es an das κB-Erkennungsmotiv in den Promotoren seiner Zielgene bindet und diese reguliert. κB-Konsensussequenz: GGGRNNYYCC (R: Purin-, Y: Pyrimidin-, N: beliebige Base)

Die Kinasen IKK α und IKK β werden für die Serin- Phosphorylisierung der I κ B- Proteine verantwortlich gemacht, was den initialen Schritt der NF- κ B- Aktivierung darstellt. Sie kommen in hetero- oder homodimerischer Form als Bestandteil hochmolekularer Komplexe im Zytosol vor (Baeuerle und Baltimore 1996; Israel 2000; Karin und Ben-Neriah 2000; Scheidereit 1998). Zusammen werden sie mit dem Adaptorprotein IKK- γ (auch „NF- κ B essential modulator“, NEMO; „IKK- associated protein 1“, IKKAP1 genannt) als I κ B-Kinase (IKK)- Komplex bezeichnet (Gosh und Karin 2002; Israel 2003; Mercurio et al. 1997; Woronicz et al. 1997). Sowohl das kinaseaktive Molekül IKK- α wie auch IKK- β weisen sehr ähnliche Primärstrukturen auf und besitzen eine N- terminale Kinasedomäne (KD), sowie ein C- terminales Helix- Loop- Helix- Motiv (HLH), das die Aktivität der KD moduliert und für Interaktion mit IKK- γ benötigt wird. Eine Leucin- Zipper- Struktur befindet sich zwischen diesen beiden Regionen. Sie ist für die Bildung der Heterodimere aus IKK- α und IKK- β notwendig (Didonato et al. 1997; Stancovski und Baltimore 1997; Woronicz et al. 1997; Zandi und Karin 1999; Rothwarf et al. 1998; Karin und Ben-Neriah, 2000) (Abb.3).

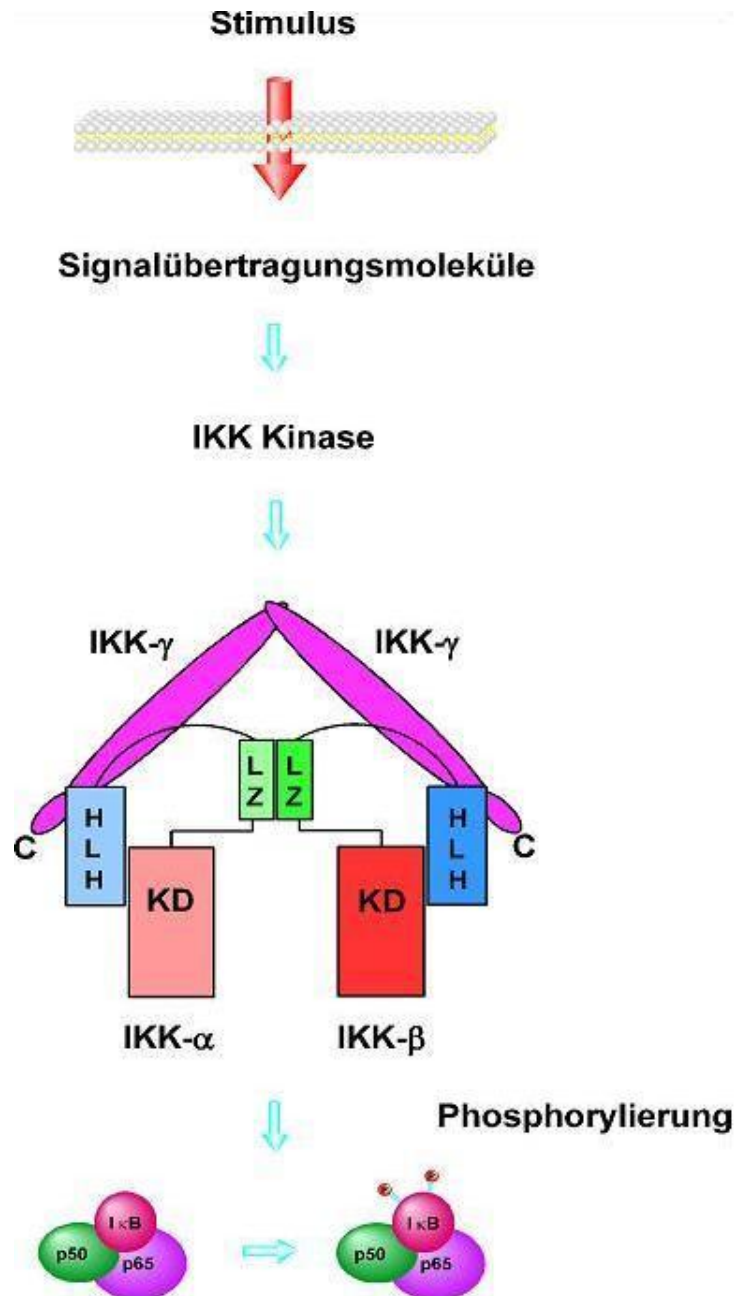


Abb. 3: Der IKK-Komplex als zentrale Schaltstelle der NF-κB-Aktivierung.

Der Komplex besteht aus den Untereinheiten *IKK-α* und *IKK-β*, die über eine *Helix-Loop-Helix (HLH)-Domäne*, ein reißverschußartiges *Leucinmotiv (LZ)*, sowie eine *Kinasedomäne (KD)* verfügen und für die *Phosphorylierung der IκB-Proteine* verantwortlich sind. Ein weiteres Element des Komplexes stellt das *Adaptorprotein IKK-γ* dar, welches über eine *C-terminale Region* die beiden Kinasen *IKK-α* und *IKK-β* miteinander verbindet. Durch *Stimulierung* kommt es zur *Phosphorylierung und Aktivierung des Komplexes* durch *IKK-Kinasen*, die ihrerseits durch oberhalb liegende *Signalübertragungsmoleküle* aktiviert werden.

In unterschiedlichen Studien wurde beobachtet, dass nur IKK- β für die Aktivierung von NF- κ B relevant und auch für die anschließende Inaktivierung des IKK-Komplexes essentiell zu sein scheint (Fischer et al. 1999; Karin und Ben-Neriah 2000). Die Bedeutung von IKK- α ist dagegen weniger aufgeklärt. Es konnte allerdings festgestellt werden, dass IKK- α in B-Zellen für die Reifung, die erhöhte Expression spezieller NF- κ B-Zielgene sowie für die Prozessierung von p100 zu p52 nötig ist (Senftleben et al. 2001). Das Adaptorprotein IKK- γ kann auf der einen Seite den IKK-Komplex stabilisieren und verfügt auf der anderen Seite auch über regulatorische Funktionen der Kinaseaktivität (Agou et al. 2002; Gosh und Karin 2002; Israel 2003; Page et al. 1999; Rothwarf et al. 1998; Scheidereit 1998; Tegethoff et al. 2003). Die genaue Stöchiometrie des IKK-Komplexes wurde bislang nicht aufgedeckt. Ebenso konnte auch die Beteiligung anderer Komponenten nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Zwei Heterodimere von IKK- α und IKK- β sind vermutlich die Baueinheit und werden von einem IKK- γ -Dimer oder Trimer zusammengehalten. Über die Leuzin-Zipper-Motive wird die Interaktion zwischen IKK- α und IKK- β vermittelt (Karin 1999; Karin und Ben-Neriah 2000). Auch IKK wird wie die I κ B-Proteine durch Phosphorylierung reguliert (Delhase et al. 1999). Die Aktivierung des IKK-Komplexes beruht dabei ausschließlich auf der Phosphorylierung von IKK- β . Die initiale Phosphorylierung soll dabei eine IKK-Kinase übernehmen und die gesamte Aktivierung von IKK dann über Trans-Autophosphorylierung laufen. Nun werden einerseits die I κ B-Proteine durch den aktivierten IKK-Komplex phosphoryliert, andererseits läuft eine extensive Autophosphorylierung im C-terminalen Bereich sowohl von IKK- α als auch von IKK- β ab. Die dadurch vermutlich entstehende Konformationsänderung führt zu einem Übergang von IKK von einem Zustand mit hoher Aktivität in einen mit niedrigerer (Delhase et al. 1999). Demzufolge wird die Aktivität von NF- κ B auch im Bereich des IKK-Komplexes genau reguliert. Eine durch Stimuli verursachte persistierende Aktivierung des Transkriptionsfaktors, wird durch diese negative Rückkopplung verhindert und damit potentiell negative Folgen für den Organismus abgewendet. Aufgrund der Tatsache, dass die Aktivierung von NF- κ B durch verschiedenste Stimuli erfolgen kann, wurden mittlerweile zahlreiche Kinasen entdeckt, die die initiale Phosphorylierung von IKK auslösen könnten (Karin und Ben-Neriah 2000). In T-Zellen und Makrophagen wurde ein weiterer IKK-Komplex gefunden, der anstatt IKK- α , IKK- β

und IKK- γ die Kinase IKK- ε bzw. IKKi enthält. (Shimada et al. 1999; Peters et al. 2000). Diese weist 27% Homologie zu IKK- α und IKK- β auf und phosphoryliert I κ B- α nach PMA- Stimulation und T- Zellrezeptor- Aktivierung (Peters et al. 2000). Die genaue Funktion dieses neuen Komplexes muss allerdings noch untersucht werden. Die aber zentrale Bedeutung des IKK- α -IKK- β -IKK- γ - Komplexes wird dadurch unterstrichen, dass das Vorhandensein von IKK- β und IKK- γ absolute Voraussetzung für die Aktivierung von NF- κ B bei einer großen Zahl von untersuchten Stimuli ist.

1.1.4 Die Bedeutung von NF- κ B in der Entzündungsreaktion

Ungefähr 200 Gene sind mittlerweile bekannt, die durch NF- κ B beeinflusst bzw. reguliert werden (Pahl 1999). Hierzu gehören viele, die Cytokine, Wachstumsfaktoren, Chemokine, zelluläre Rezeptoren sowie Proteine kodieren, welche wiederum an der Antigenpräsentation, Zelladhäsion, Akute-Phase-Reaktion und der Stressantwort beteiligt sind (Akira und Kishimoto 1997). Die besondere Bedeutung des Transkriptionsfaktors bei Entzündungsreaktionen und im Immunsystem wird durch diese Schlüsselrolle dargestellt (Gosh et al. 1998). Denn einige dieser von NF- κ B induzierten Proteine und Faktoren, können den Transkriptionsfaktor selbst aktivieren (Collins et al. 1995). Beispielsweise gehören die Cytokine TNF α , IL-1 sowie IL-6 dazu und sind zugleich auch die wichtigsten NF- κ B gesteuerten Akute-Phase-Regulatoren (Baldwin 1996). Desweiteren nimmt NF- κ B eine grundlegende Rolle in physiologischen Differenzierungsprozessen, der Zellzyklusprogression sowie der Apoptose ein (Baldwin 1996; Aggarwal 2000; Chen et al. 2001; Tak und Firestein 2001; Barkett und Gilmore 1999). Die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors ist ein sehr komplexer und genau gesteuerter Prozess, durch den es dem Organismus möglich ist, auf stressinduzierte und pathogene Stimuli adäquat zu reagieren. Möglich wird dies, weil NF- κ B in den meisten Geweben vor allem inaktiviert vorliegt und nur temporär induziert wird. Ist dieser Ablauf einmal defekt, können zahlreiche pathologische Prozesse in Gang gesetzt werden, die in den meisten Fällen mit einer erhöhten NF- κ B- Aktivität einhergehen. Dies wird vor allem bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Krebs deutlich (Rayet und Gelinas 1999; Makarov 2000). Ein entscheidender Faktor bei der Entstehung von Entzündungsreaktionen ist die Rekrutierung von Monozyten, Granulozyten sowie T- Lymphozyten aus dem Kreislauf an den Ort der Inflammation

(Nichols et al. 2001). Die dort aktivierten Leukozyten produzieren nun ihrerseits proinflammatorische Mediatoren, die das Entzündungsgeschehen initiieren und fortschreiten lassen. Die schon erwähnten proinflammatorischen Cytokine $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 aktivieren NF- κ B in dieser Anfangsphase der Entzündung, was wiederum zur Produktion von weiteren entzündungsfördernden Cytokinen und zur Expression von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 sowie E-Selektin führt. Diese sind für das Rekrutieren und Aktivieren der Leukozyten verantwortlich. Die durch das aktivierte NF- κ B induzierten proinflammatorischen Zielgene sind unter anderem IL-1, IL-2, IL-6, IL-17, $\text{TNF}\alpha$, MCP-1, GM-CSF, COX-2, ROI sowie iNOS (Tak und Firestein 2001; Chen et al. 1999; Makarov 2000). Der durch die örtliche Aktivierung von NF- κ B ausgelösten Stressreaktion mittels ROIs (Reactive Oxygen Intermediates) und dem Anschalten des Enzyms iNOS (inducible Nitric Oxidase Synthase) kommt eine Schlüsselrolle zu (van der Berg et al. 2001). Bei zahlreichen chronisch-entzündlichen Erkrankungen wird neben der breiten aktivierenden Wirkung von NF- κ B auf Chemokine, Zytokine, Immunrezeptoren und Adhäsionsmoleküle auch eine erhöhte Expression des iNOS- Enzyms in den Epithelien der Atemwege, in Makrophagen von Asthmatikern, in den Epithelien der Kolonschleimhaut bei Colitis ulcerosa, bei Lupus erythematoses sowie in den Synovialzellen bei rheumatoider Arthritis festgestellt (Baldwin 2001). In diesen Fällen kommt es nicht zur Auflösung der Entzündung durch Bildung antiinflammatorischer Mediatoren und zur Apoptose der eingewanderten Leukozyten, sondern zu einem Persistieren von aktivierten NF- κ B in den Entzündungsherden, was ein chronisch entzündliches Geschehen zur Folge hat. Auch bei Arteriosklerose und Glomerulonephritiden ist eine abnormale NF- κ B- Aktivität festgestellt worden (Tak und Firestein 2001; Chen et al. 1999; Makarov 2000; Fan et al. 2001; Baeuerle und Henkel 1994; Barnes und Karin 1997). Selbst die Begleitsymptome der chronischen Erkrankungen, wie z.B. die durch Metalloproteinasen (MMP) und Osteoklasten hervorgerufenen Gewebeschädigungen bei rheumatoider Arthritis, können von NF- κ B verursacht sein (Makarov 2000). Da NF- κ B auch an der Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt ist, spielt dieser Transkriptionsfaktor ebenfalls bei der Entstehung von Neoplasien eine Rolle. In den meisten Situationen fördert er nämlich die Zellzyklusprogression und hemmt die Apoptose (Chen et al. 2001). Dies erklärt, warum in zahlreichen Tumoren (z.B. Mammakarzinome, Lungenkarzinome, Schilddrüsenkarzinome, Melanome, Colonkarzinome) eine deutlich

erhöhte NF- κ B- Aktivität gefunden wird und ein verstärktes Tumorwachstum sowie eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika damit in Korrelation gebracht werden können (Mercurio und Manning,1999; Rayet und Gelinas 1999; Wang et al. 1999; Aggarwal 2000; Chen et al. 2001).

1.2 Akutes Lungenversagen / ARDS

Nach schweren Traumen und während entzündlicher Prozesse werden zahlreiche proinflammatorische Mediatoren freigesetzt. Ein bedeutendes Zielorgan dieser Prozesse ist die Lunge, was sich in vielen Erkrankungen widerspiegelt. Das akute Lungenversagen ist das Ergebnis eines komplexen Zusammenwirkens zwischen Entzündungszellen und immunologischen Mediatoren. Auch der ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktor NF- κ B, der wie schon beschrieben eine besondere Rolle bei der Regulation von proinflammatorischen Cytokinen spielt, wirkt bei der Pathogenese des akuten Lungenversagens mit.

1.2.1 Definition und Epidemiologie

Das akute Lungenversagen, anfangs auch „Schocklunge“ bzw. „septische Lunge“ genannt, wurde im Jahre 1967 von Ashbaugh et. al. als ein klinisches Syndrom beschrieben, dass durch Tachypnoe, diffuse alveoläre Infiltrate, persistierende Hypoxämie trotz Sauerstoffbeatmung sowie verminderte pulmonale Compliance charakterisiert wurde. Später setzte sich für diese Lungenfunktionsstörung der Begriff ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome) durch. Aber erst die North-American-European-Consensus Conference (NAECC) legte sich auf eine einheitliche Definition dieses Syndroms fest. Ein akuter Beginn, niedrige Sauerstoffpartialdrücke ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300 \text{ mmHg}$), bilaterale diffuse Infiltrate, die auf einer Röntgenthorax-Aufnahme (pa) sichtbar sind und der Ausschluss einer Linksherzinsuffizienz charakterisieren den mittleren Schweregrad, das sogenannte Acute Lung Injury (ALI). Von einem Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS), dem hohen Schweregrad, spricht man, wenn der Sauerstoffpartialdruck zusätzlich noch unter 200 mmHg fällt. (Herold 2005; Wyncoll und Evans 1999; Bernard et al. 1994; Atabai und Matthay 2002; AWMF 1996).

ARDS stellt auch in der heutigen Intensivmedizin nach wie vor ein Problem dar. Je nach Studienansatz schwankt die Inzidenz zwischen 5-50 Fällen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr. (Herold 2005; Hudson und Steinberg 1999; Villar und Slutsky 1989; Hudson et al. 1995).

Die Prognose, dass heißt die Letalität, ist abhängig von der Grundkrankheit und kann zwischen 10% bis über 80% liegen. Alkoholabusus und extrapulmonale Erkrankungen erhöhen die Letalität zusätzlich (Herold 2005).

1.2.2 Pathogenese

Als Ursache muss man zwischen direkten und indirekten pulmonalen Schädigungen unterscheiden. Direkte entstehen zum Beispiel durch Aspiration von Mageninhalt oder Süß- bzw. Salzwasser, beatmungspflichtige Pneumonien, Intoxikationen mit Paraquat, Narkotika u.a., Inhalation toxischer Gase (z.B. NO₂, Rauchgase u.a.) oder hyperbarem Sauerstoff. Indirekte Schädigungen können durch Sepsis, Polytrauma, Fettembolie, Verbrennung, Massentransfusion, Verbrauchskoagulopathie, einer akuten Pankreatitis sowie Schock verursacht sein (Herold 2005). Die sekundären Ereignisse liegen dabei eindeutig in der Mehrzahl der Fälle vor. Besonders Polytrauma, Verbrennung, Schock und Sepsis sind ursächlich für dieses Krankheitsbild (Hudson und Steinberg 1999; Hudson et al. 1995). An erster Stelle steht jedoch eindeutig die Sepsis als Ursache für diese massive Lungenfunktionsstörung und das klinische Bild des ARDS (Villar und Slutsky 1989; Martin und Silverman 1992). Bakterielle Endo- und Exotoxine sind entscheidende Auslöser einer inflammatorischen Kettenreaktion, die sich erst als ARDS und letztendlich als ein Multiorganversagen manifestieren kann (Martin und Silverman 1992; Brigham und Meyrick 1986; Ulevitch 1991).

Auf der äußeren Membran gramnegativer Bakterien sind sogenannte Lipopolysaccharide (LPS) als Endotoxine lokalisiert. Freigesetzte LPS bewirken neben einer direkten Schädigung der Organe auch die Aktivierung diverser proinflammatorischer Zellen wie Granulozyten, Monozyten, B-Lymphozyten und Alveolamakrophagen. Diese aktivierten Immunzellen setzen nun ihrerseits aggressive Mediatoren frei, um Bakterien zu töten und deren Toxine zu inaktivieren. Bei diesen Mediatoren handelt es sich um proinflammatorische durch NF-κB beeinflussbare und NF-κB beeinflussende Zytokine, wie z.B. IL-1, IL-6, IL-8, aber auch der Tumornekrose-Faktor α (TNF α). Sie bewirken in anderen Zellen wiederum die Freisetzung von NO, Komplementfaktoren, PAF und Prostanoiden (Andersen et al. 1985).

In mehrere Stadien geteilt, gehört zu den pathophysiologischen Veränderungen des ARDS eine exsudative Phase, die durch eine gesteigerte Kapillarpermeabilität sowie

einer prä- und postkapillären Vasokonstriktion gekennzeichnet ist und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen, Proteasen sowie Entzündungsmediatoren zur Folge hat. Daraus resultiert ein interstitielles Lungenödem, welches zum Untergang der alveolären Typ II – Zellen, damit zur verminderten Bildung des Surfactant factors und nun wiederum zum Einstrom proteinreichen Exsudates in die Alveolen (alveoläres Lungenödem) führt. Als Konsequenz aus dem Missverhältniss zwischen Lungenperfusion und Ventilation bilden sich Mikroatelektasen und hyaline Membranen, die in einem intrapulmonalen Rechts-Links-Shunt mit Hypoxie gipfeln. In der sogenannten proliferativen Phase, dem irreversiblen Stadium des ARDS, kommt es durch eine Aktivierung von Makrophagen und Fibroblasten zur Ausbildung einer Lungenfibrose sowie einer Endothelproliferation der Alveolarkapillaren. Diese erhöhte Diffusionsstrecke führt letztendlich zu einer zunehmenden Perfusionsverschlechterung mit einer respiratorischen Globalinsuffizienz (Herold 2005).

1.2.3 Klinik

Eine arterielle Hypoxämie, Dyspnoe und Tachypnoe sind dann die klinischen Leitsymptome. (Herold 2005; Renz-Polster et al. 2004). Wobei das erste Stadium zunächst durch die Hypoxämie sowie einer Hyperventilation mit einer respiratorischen Alkalose gekennzeichnet ist. Darauf folgt meist eine zunehmende Atemnot mit beginnenden Röntgenveränderungen der Lunge, die in der Form beidseitiger fleckiger bzw. streifiger Verdichtungen kenntlich werden. In der proliferativen Phase kommt es wie schon erwähnt zu einer respiratorischen Globalinsuffizienz (Hypoxämie und Hyperkapnie), die mit einer respiratorischen Azidose und zunehmenden beidseitigen Verschattungen der Lunge einhergeht. Aus diesem Grund sind Röntgenverlaufskontrollen unerlässlich, da vor allem die beidseitigen diffusen Lungenveränderungen beim akuten Lungenversagen differentialdiagnostisch von einer meist einseitig verlaufenden Pneumonie zu unterscheiden ist. Außerdem muss auch ein kardial bedingtes Lungenödem ausgeschlossen werden, um ein ARDS zu diagnostizieren (Herold 2005).

1.2.4 Therapie

Die Therapie des akuten Lungenversagens muss sowohl kausal als auch symptomatisch erfolgen. Auf der einen Seite sollte die auslösende Ursache wie zum Beispiel ein Schockzustand beseitigt, auf der anderen muss durch verschiedene Beatmungsmethoden eine symptomatische Kreislaufstabilisierung in der Akutsituation erreicht werden.

An erster Stelle steht hier die lungenprotektive Beatmung, aber auch die Hochfrequenzoszillationsventilation (HFOV), extrakorporale Verfahren des Gasaustausches („extracorporeal lung assist“ = ECLA) wie die CO₂ – Elimination mit dem extrakorporalen Membranoxygenator (EKMO) über einen veno-venösen Bypass oder der intravaskuläre Oxygenator (IVOX) stellen eine alternative Beatmungsform dar (Herold 2005).

Dennoch wird vor allem die lungenprotektive Beatmung als Interventionsmethode eingesetzt, da sie die Letalität (mortality) nachweislich senken konnte (ARDSNetwork 2000 NEJM).

Ein niedriger Spitzendruck (< 30 mbar), ein ausreichend hoher PEEP – positive end-expiratory pressure (9-12 mbar) sowie niedrige Tidalvolumina sind entscheidend für eine erfolgreiche Behandlung. Außerdem ist eine intermittierende Bauchlagerung zur Prophylaxe dorsaler Atelektasenbildung notwendig. Eine leichte Hyperkapnie kann akzeptiert werden (permissive Hyperkapnie), sofern der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) über 60 mmHg bzw. die Sauerstoffsättigung (SaO₂) über 92% liegt. Sobald eine Spontanatmung wieder möglich ist, sollte allerdings auf assistierte Spontanatmungsverfahren (z.B. BIPAP) gewechselt werden (Herold 2005).

1.3 Beatmung und beatmungsinduzierte Lungenschädigung

1.3.1 Das Alveolarsystem der Lunge

Der alveolare Raum ist von einem dünnen Alveolarepithel ausgekleidet, welches einen Surfactantfilm synthetisiert, der für den physiologischen Ablauf des Respirationszyklus enorm wichtig ist. Es muss den Organismus vor inhalierten Umweltnoxen schützen und gleichzeitig den Gasaustausch gewährleisten. Die alveolaren Epithelzellen sind hierfür mit Ionenkanälen bzw. –pumpen ausgestattet und besitzen die Fähigkeit, immunmodulatorische Mediatoren und Matrixkomponenten zu sezernieren sowie aktiv alveolären Surfactant zu produzieren. Es gibt zwei verschiedene Arten von Alveolarepithelzellen - Pneumozyten Typ-I und Typ-II. Erstere, sehr große flache Zellen mit wenig Zytoplasma, bedecken ca. 90% der Alveolaroberfläche und machen etwa 8% der Lungenparenchymzellen aus. Sie lagern sich großflächig einer Basallamelle an, die wiederum mit der Basalmembran der Endothelzellen der Alveolarkapillaren verschmilzt. Zusammen bilden sie damit die Barriere für den Gasaustausch an der Alveolarwand. Wobei das dünne Zytoplasma der Typ-I Pneumozyten den Gasaustausch der Lunge durch Minimierung der Diffusionsstrecke erleichtert (Morgenroth 1986). Die Typ-II Zellen haben einen Durchmesser von ca. 9 µm und im Gegensatz zu den Alveolarepithelzellen Typ-I ist das Zytoplasma reich an Organellen. Besonders Lamellenkörper sind charakteristisch für diese Zellart und haben einen Anteil von 18-24% am Zytoplasma. Sie sind als Substrat der Syntheseleistung dieser Zellen aufzufassen, wo auch der Ursprung der intrazytoplasmatisch gebildeten, oberflächenaktiven Substanzen, dem Surfactant, liegt. Dieser ist eine Mischung (Emulsion) aus Phospholipiden, Proteinen sowie Kohlenhydraten (Morgenroth 1986) und setzt so die Oberflächenspannung der gesamten Lunge herab, was die reibungslose Inspiration überhaupt erst möglich macht.

Durch „tight-junctions“ stehen die beiden Alveolarepithelzellentypen miteinander in Verbindung und errichten so die eigentliche epitheliale Barrierefunktion. Für den intra- und interzellulären Transport von Ionen und Kleinmolekülen sind sogenannte „Gap-junctions“ zuständig, die aber in wesentlich geringerer Zahl zwischen den beiden Pneumozytenarten vorkommen (Bartels et al. 1980). Durch diese Zell-Zell-Verbindungen wird die Permeabilität des alveolaren Epithels reguliert. Sie sind aber

gegenüber mechanischen Belastungen nur in geringem Maße beanspruchbar (Mason und Shannon 1997).

Typ-II Zellen sind im Gegensatz zu den Typ-I Pneumozyten in der Lage, zu proliferieren und sich zu Typ-I Zellen zu differenzieren (Evans et al. 1975). Dieser Prozess wird Transdifferenzierung bezeichnet und beschreibt die Umwandlung einer hoch differenzierten Zelle zu einer weniger differenzierten Zelle, wie der Typ-I Zelle (Fehrenbach et al. 1999). Dadurch ist es den Pneumozyten Typ-II möglich, auf Schädigungen des Alveolarepithels adäquat mit Reparatur- bzw. Proliferationsprozessen zu reagieren (Evans et al. 1975). Eine Transdifferenzierung kann man nach einer gewissen Zeit auch bei Primärkulturen von Typ-II Zellen beobachten, die in vitro kultiviert worden, da ihnen danach zellspezifische Charakteristika fehlen (z.B. Verlust der kuboidalen Zellform und der Lamellarkörper) (Shannon et al. 1987).

Typ-II Zellen sind außerdem in der Lage, bioaktive Faktoren zu synthetisieren, die eine inflammatorische Reaktion initiieren und unterhalten können. Da sie immunkomponente Zellen sind, können sie einen chemotaktischen Gradienten aufbauen, der zur Rekrutierung von Makrophagen aus dem Pool peripherer Monozyten des Blutes führt. Dieser Prozess ist bei akuten und chronischen Lungenerkrankungen zu beobachten, die durch die Präsenz von aktivierten Makrophagen und anderen Entzündungszellen gekennzeichnet ist (ONEil et al. 1984).

1.3.2 Effekte von mechanischer Dehnung auf die Alveolarepithelzellen

Es ist mittlerweile bekannt, dass bei der Regulation, Funktion und Metabolismus der Lungenzellen physikalische Kräfte eine entscheidende Rolle spielen (Riley et al. 1990). Sind sie abnormal, können daraus aber auch unterschiedliche pathologische Prozesse resultieren, die das Lungengewebe schädigen. So bedürfen die durch mechanischen Stress hervorgerufenen Krankheiten der Lunge wie z.B. das Barotrauma, infolge der intensivmedizinischen künstlichen Beatmung, Pulmonary Hypertension, Pulmonary Hypoplasia, Asthma bronchiale oder COPD noch einer intensiveren Forschung, um erfolgreich präventiv und therapeutisch gegen sie vorgehen zu können. Denn wie schon erwähnt, sind die Regelkreise intrazellulärer Signaltransduktionswege, die durch mechanische Stimulation ausgelöst werden, noch nicht ausreichend aufgeklärt.

Allerdings sind bereits einige Versuche mit Zellen des menschlichen Organismus durchgeführt worden, die mechanischem Stress ausgesetzt waren, wie z.B. zelluläre und molekulare Antworten von Herzmuskelzellen auf mechanische Dehnung (Sandozima und Izumo 1997), Genregulation durch mechanische Dehnung von Endothelzellen (Resnick et al. 1997), Mechanotransduktion von Gefäßmuskelzellen (Osol 1995), Knochenzellen (Turner et al. 1995) sowie Endothelialzellen (Davies 1995; Davies et al. 1997). Wie aber genau die mechanisch intrazelluläre Signaltransduktion bei durch mechanische Dehnung stimulierten Lungenzellen abläuft, wurde bisher in noch nicht ausreichendem Maße untersucht.

Bekannt ist, dass mechanische Beatmung zu einer Zunahme von proinflammatorischen Zytokinen und Mediatoren führt wie z.B. TNF- α , Interleukine wie IL-1 β , IL-6 und IL-10. Diese Erkenntnisse stammen aus der Auswertung von Lungenlavagen von isolierten Rattenlungen (Tremblay et al. 1997).

Die Freisetzung des Interleukins IL-8 beobachtete man bei der Belastung der auch in dieser Arbeit untersuchten human-alveolaren Epithelzelllinie A549 mit dem Flexercell Stretchgerät (Vlahakis et al. 1999).

Inflammatorische Zytokine, die während der künstlichen Lungenbeatmung synthetisiert werden, sind in der Lage, zur Entwicklung eines akuten Lungenversagens wie ARDS sowie zu multiplen Organschädigungen wie bei MSOF beizutragen (Liu und Slutsky 1997).

Auch von Bethmann et.al. zeigte, dass bei isolierten Mäuselungen höhere Werte von TNF- α , und IL-6 im Perfusat gemessen wurden, wenn die mechanische Dehnung über die physiologische Atemfrequenz und –amplitude hinaus erhöht wurde (von Bethmann et al. 1998).

Es konnte ebenfalls beobachtet werden, dass primär in Kultur gelegte alveolare Epithelzellen, prozentual weniger Schaden nahmen, wenn sie am fünften und nicht am ersten Tag gedehnt wurden (Tschumberlin und Margulies 1998). Allerdings wandeln sich die Typ-II Zellen nach längerer Kulturzeit morphologisch in Typ-I Zellen um.

Auch die Prostaglandinsynthese wird durch mechanische Dehnung beeinflusst. So ist bekannt, dass die Synthese von biologisch aktiven Eicosanoiden durch die Epithelzellen der Luftwege zur Regulierung des Tonus der glatten Muskeln in den Luftwegen beiträgt und proinflammatorisch wirkt. In einer Studie konnte die Abnahme der

Prostaglandinsynthese unter anderem von PGE₂, PGI₂, Thromboxane A₂ von Katzen sowie humanen Lungenepithelzellen unter zyklischer Dehnung mit dem Flexercell Stretch Gerät beobachtet werden (Savla et al. 1997). Im Gegensatz dazu wurde in anderen Studien eine rapide Zunahme von Prostacyclinen unter Scheerstress bei fetalen Rattenlungenzellen gezeigt (Reeves et al. 1983; Skinner et al. 1992).

Insgesamt wurde festgestellt, dass Alveolarschäden mit dem Ausmaß und der Dauer der Dehnung zu- und mit der zellulären Dichte abnehmen (Tschumperlin und Margulies 1998).

Wie die mechanische Belastung aber genau die Zellen beeinflusst und dieses Signal intrazellulär verarbeitet wird, ist bisher nur unzureichend beschrieben worden. Das Modell der Stretch-aktivierten Ionenkanäle und das Extrazellulär-Integrin-Cytoskelett-Modell sind die am meisten beachteten Erklärungsversuche (Ingber 1991; Ingber 1993; Maniotis et al. 1997).

Abgesehen von der Zytokinausschüttung beeinflusst die mechanische Dehnung auch die Zellproliferation. So konnte bei einer Studie mit fetalen Rattenlungenzellen die stärkste (3H) Thymidin Incorporation in die DANN bei 1%-igem FCS-Medium und damit eine Proliferation bei 12, 24 und 48 Stunden nach mechanischer Dehnung beobachtet werden (Liu et al. 1992; Scott et al. 1993; Harding 1991). Ebenfalls zeigten humane Lungen-Fibroblasten der Zell-Linie IMR-90 ein Wachstum unter mechanischer Belastung (Liu et al. 1995; Xu et al. 1998).

1.3.3 Darstellung verschiedener experimenteller Dehnungsmechanismen

Es existieren sehr unterschiedliche Möglichkeiten, die künstliche Beatmung bzw. die mechanische pulmonale Belastung zu untersuchen. Jede Methode hat seine Vor- und Nachteile. Im Folgenden sollen drei etablierte Verfahren kurz vorgestellt werden: das Tiermodell, das Modell der isolierten Tierlunge und das zelluläre Modell, welches auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

1.3.3.1 Tiermodell

Das intakte Ganztiermodell wird vor allem bei Kaninchen, aber auch Ratten verwendet. Ein sediertes und beatmetes Tier wird über den gesamten Versuchsablauf kontinuierlich überwacht. Ein pulmonal-arterieller Katheter (PAKatheter) und eine intraarterielle Blutdruckmessung ermöglichen eine permanente Messwerterfassung. Außerdem können über die Katheter mittels Blutentnahmen verschiedene Blutparameter erhoben und auch verschiedene Substanzen appliziert werden. Die Vitalparameter der Versuchstiere werden in regelmäßigen Abständen dokumentiert. Die kontinuierliche Überwachung der Sauerstoffsättigung erfolgt mittels Pulsoximetrie.

Ein Auskühlen der Tiere kann mit Hilfe einer unter den Tieren platzierten Wärmedecke verhindert werden. Im Gegensatz zum Modell der „Isolierten Lunge“ bietet das Ganztiermodell die Möglichkeit, neben physiologischen Reaktionen der Lunge komplexe Systeme wie beispielsweise das Herzkreislaufsystem und extrapulmonale metabolische Prozesse mitbeobachten zu können.

1.3.3.2 Isoliertes Organ

Die komplexen (patho)physiologischen Relationen der mechanischen Beatmung unabhängig von zentralnervösen, humoralen und metabolischen Einflüssen des Organismus zu untersuchen, ist in dem blutfrei perfundierten, ventilierten und isolierten Organ möglich. Die Arbeitsgruppe Seeger et al. (Seeger et al. 1994) setzt das Modell der isolierten Kaninchenlunge seit 1980 in verschiedenen Modifikationen ein. Seit 1995 ist das Modell der isolierten perfundierten Rattenlunge in Gießen etabliert (Ermer et al. 1998).

Zur Durchführung des Versuches wird die mit einem definierten Gasgemisch beatmete Lunge dem Tier entnommen und mit Hilfe eines Perfusionssystems rezirkulierend mit einer Elektrolytlösung perfundiert. Die Veränderungen des Lungengewichts können ebenso kontinuierlich und computergestützt aufgezeichnet werden wie der pulmonalarterielle-, pulmonalvenöse- sowie der Beatmungsdruck. Während des Versuchs ist es möglich, dem Perfusat verschiedene Wirkstoffe in bestimmten Konzentrationen zuzuführen und die Reaktion der Lunge anhand der Veränderungen der gemessenen Parameter zu registrieren. Weiterhin besteht die Möglichkeit, in zeitlich festgelegten Abständen Proben aus dem zirkulierenden Perfusat für weitere Untersuchungen zu entnehmen. Auf diese Weise können die in das Perfusat exprimierten Mediatoren, welche die Lunge als Reaktion auf die zugegebenen Wirkstoffe abgibt, mittels ELISA-Messungen quantitativ bestimmt werden.

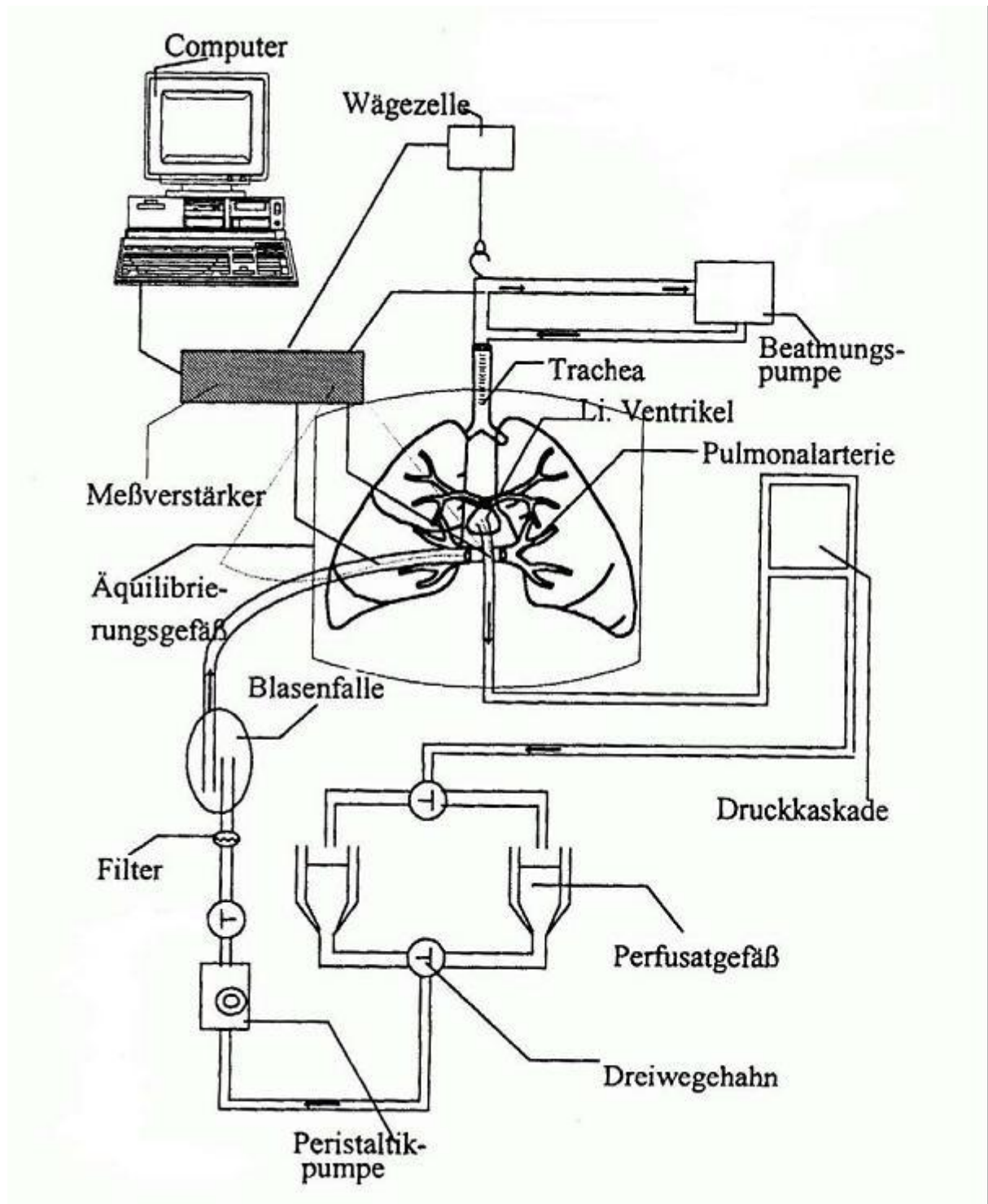


Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der isolierten Tierlunge

1.3.3.3 Zelluläres Modell (Zell stretch in vitro)

Physikalischer Stress bzw. mechanische Dehnung können physiologische und pathophysiologische Effekte bei Lungenzellen bewirken. Durch die Atmungsluft, den Blutfluss und die Atembewegungen im Pleuraspalt unterliegen die Alveolarzellen bestimmten Dehnintensitäten. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Geräte entwickelt, um die Zellen zu dehnen und so die intrazellulären Prozesse, die durch den physikalischen Stress ausgelöst wurden, besser untersuchen zu können. Diese Methode ist auch bei der vorliegenden Arbeit gewählt worden. Dabei werden verschiedene Gruppen von Geräten unterschieden: z.B. statische versus cyclische, uniaxiale gegen biaxiale oder zweidimensionale im Vergleich zu Geräten mit dreidimensionaler Dehnung.

Im Folgenden sollen die wichtigsten Unterschiede der Dehnmethoden beschrieben werden.

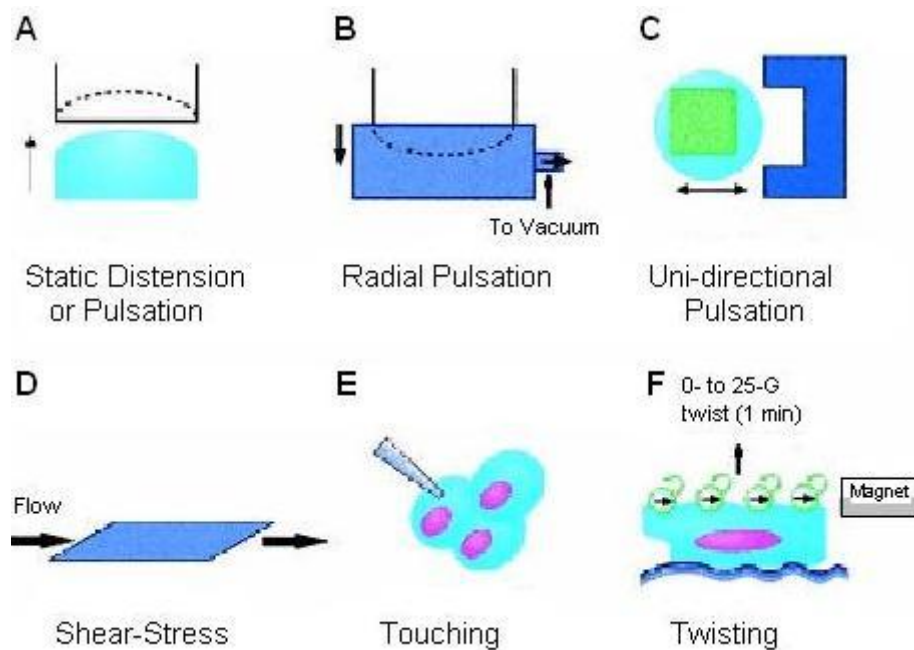


Abb. 5: Schematische Darstellungen der Geräte, die zur mechanischen in vitro Stimulation von Zellen benötigt werden

Schema A: Die elastische Membran wird durch den positiven Druck von unten nach oben bewegt (Wirtz und Dobbs 1990). Die Zellen auf der Membran werden dadurch biaxial gedehnt.

Schema B: Diese Dehnmethode wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Mit einer computergesteuerten Vakuumpumpe wurde unter speziellen Silikonmembranen ein Unterdruck erzeugt, der damit den Boden der 6'er Well Platten nach unten bewegte. Wobei die Zellschicht auf der Membran dadurch equibiaxial gedehnt werden konnte. Die Adhärenz der Zellen an den Platten kann durch das Auftragen verschiedener extrazellulärer Substanzen erreicht werden. Außerdem sind sowohl unterschiedliche biaxial-cyclische wie auch biaxial-statische Dehnmuster möglich (Bishop et al. 1993; Tschumperlin und Margulies 1998; Winston et al. 1989). In Bezug auf die Korrelation der Dehnung zwischen der Membran und der darauf liegenden Zellschicht gibt es ähnliche Erkenntnisse. Bei Winston et. al. wird beschrieben, dass die Zelldehnung 60% der Membrandehnung beträgt (Winston et al. 1989). Dass die Zelldehnung verglichen mit der Membrandehnung geringer ausfällt, konnten auch Wirtz und Dobbs feststellen (Wirtz und Dobbs 1990).

Schema C: Hier werden die Zellen in einer dreidimensionalen Kultur gedehnt. Der Phänotyp von Lungenzellen, besonders der Typ-II Zellen, kann sich bekanntermaßen in vitro schnell verändern, sodass sie ihre Fähigkeit, Surfactantproteine zu bilden, nach einer gewissen Zeit verlieren. Die Aufrechterhaltung der Zell-Morphologie und des Phänotyps der Lungenzellen konnten Simpson et. al. (Simpson et al. 1985) aber in einer dreidimensionalen Umgebung aufzeigen. Ursprünglich wurde das Dehnmodell von Skinner entwickelt (Tschumperlin und Margulies 1998) und später dann zu einem computergesteuerten Bio Stretch System weiterentwickelt (Liu et al. 1999).

Schema D: Beim Scheerstress wird eine parallele Platte unter einem Zellmonolayer in nur einer Richtung hin und her bewegt (Tran-Son-Tay 1993). Allerdings wird bei diesem Modell die Tatsache vernachlässigt, dass Zellen durch die Luftwege, pulmonale Blutgefäße und Pleuralraum nicht nur vom Sheerstress, sondern auch vom mechanischen Stress beeinflusst werden.

Schema E: Hier kann eine einzige Zelle gezielt gedehnt werden (Sanderson und Dirksen 1986). Mit Hilfe eines Mikromanipulators wird in die Nähe der Membran der

Zelle eine Glaspipette mit $\sim 1 \mu\text{m}$ Spitzendurchmesser positioniert. Die Zelle wird dann mit einem Computer-kontrollierten Piezoelectric-Gerät in Bewegung versetzt.

Schema F: Bei diesem Modell dienen spezifische Antikörper dazu, die Zellen an kugelförmige eisenhaltige Perlen zu binden. Der Scheerstress an der Zelloberfläche entsteht hier durch Magnetfelder, die die Zellen in Drehung versetzten (Wang et al. 1993; Hubmayr et al. 1996).

1.3.4 Ventilatorinduziertes Lungenversagen / VILI

Obwohl die künstliche bzw. mechanische Beatmung bei der Therapie des akuten Lungenversagens eine wichtige und bedeutende Rolle spielt, kann sie selbst zu einer massiven Lungenschädigung und letztendlich auch zum Tode durch Multiorganversagen führen. Die maschinelle Ventilation führt zu hämodynamischen Veränderungen, die durch den positiven intrapulmonalen Druck entstehen können. Ein Barotrauma, eine ventilatorassoziierte Pneumonie sowie das ventilatorinduzierte Lungenversagen sind ebenfalls mögliche Nebenwirkungen der Behandlung (Brower und Fessler 2000). Nicht nur der Beatmungsdruck (Barotrauma) kann pathologische Veränderungen hervorrufen, sondern auch die Überdehnung der Alveolen (Volutrauma) und die Entwicklung von Scherkräften, besonders in Verbindung mit Atelektasen (Atelektrauma) stellen Faktoren bei der Entwicklung des akuten Lungenversagens dar (dos Santos und Slutsky 2000). Unter dem Begriff Barotrauma wird dabei heute lediglich das Vorhandensein von extraalveolärer Luft verstanden. Weg et al. konnten in ihrer Studie allerdings feststellen, dass es keinen Zusammenhang zwischen der Höhe des Beatmungsdruckes und der Manifestation eines Barotraumas gibt und andere Faktoren wie z.B. Infektionen und Traumata eine größere Rolle dabei spielen müssen (Weg et al. 1998). Auch Dreyfuss et al. stellte an beatmeten Ratten fest, dass das Atemzugvolumen einen viel größeren Einfluss auf die Ausprägung eines ventilatorinduzierten Lungenödems hat, als der Beatmungsdruck. So wurde die Lunge am wenigsten bei geringem Volumen und hohem Druck geschädigt (Dreyfuss et al. 1988). Dies ist damit erklärbar, dass durch erhöhte Atemzugvolumina Risse in der Alveolar- sowie Kapillaroberfläche hervorgerufen werden. Diese Risse können eine inflammatorische Reaktion verursachen und somit als ein Bindeglied zwischen

mechanischen Kräften und biologischer Reaktion angesehen werden (West et al. 1991; Shirley et al. 2000; Fishman und Pietra 1979). Zusätzlich zu den hohen Tidalvolumina ist auch der Einfluss von Scherkräften bei der Entwicklung des akuten Lungenversagens wichtig. Diese entstehen durch ein Ungleichgewicht in der Belüftung der kranken Lunge. Atelektatische Areale werden nicht ventiliert, wohingegen gesunde um so stärker belüftet werden. Zwischen diesen Arealen entstehen dann beachtliche Scherkräfte (Mead et al. 1970). Durch die Applikation eines PEEP kann man aber einen repetitiven Alveolarkollaps verhindern (Argiras et al. 1987). Fehlt dieser, haben Studien gezeigt, dass die Kombination aus Scherkräften mit wiederholter Dehnung und Kollaps der Alveolen zur Produktion von inflammatorischen Mediatoren bzw. Zytokinen führen (Muscedere et al. 1994; Laskin et al. 1994; Nathan 1987). Deshalb ist die durch hohe Tidalvolumina initiierte Traumatisierung der Alveolen nicht allein für die Entwicklung der Lungenfunktionsstörung verantwortlich, sondern auch die nachfolgend entstehende inflammatorische Reaktion. Aufrechterhalten wird diese durch die Aktivierung und Interaktion von lokalen sowie systemischen inflammatorischen Mediatoren (Slutsky und Ranieri 2000; Chiumello et al. 1999; Ranieri et al. 1999). Durch den Dehnungsreiz kommt es zur Freisetzung von unter anderem NF- κ B beeinflussenden und NF- κ B beeinflussbaren Zytokinen. Durch schädigende Ventilationsstrategien erfolgt eine Zunahme von TNF- α sowie Interleukinen wie IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, aber auch Mediatoren wie MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein) und Interferon- β (Tremblay et al. 1997; Vlahakis et al. 1999). Eine Dehnung der Lungenzellen kann also neben reversiblen Veränderungen durch ein Beatmungstrauma auch zu irreversiblen Schädigungsmechanismen und zur Umstrukturierung von Alveolen beitragen. Eine massive Granulozytenverteilung von der Lunge (Alveolen) ausgehend über das Herz in den großen Kreislauf als Folge eines durch alveoläre Überdehnung initiierten Entzündungsgeschehens, kann schließlich eine entscheidende Rolle beim MSOF (Multiple System Organ Failure) und Schock spielen (Slutsky und Tremblay 1998; Donnelly und Haslett 1992; Imanaka et al. 2001).

1.4 Aufgabenstellung

Diese Arbeit möchte sich deshalb der Aufgabe stellen, herauszufinden, ob der Transkriptionsfaktor NF- κ B beim akuten Lungenversagen bzw. bei der pulmonalen Schädigung durch alveoläre Überdehnung eine Bedeutung hat und wenn ja, in welchem Maße es eine Korrelation zur Zellschädigung gibt. In diesem Zusammenhang soll auch die Frage geklärt werden, ob er in verschiedenen Zellarten unterschiedlich exprimiert wird, welche Rückschlüsse sich aus den eventuellen Unterschieden ziehen lassen und welche abschließenden Aussagen die Ergebnisse zulassen.

2 Fragestellung

Obwohl die künstliche bzw. mechanische Beatmung bei der Therapie von ALI / ARDS eine wichtige und bedeutende Rolle spielt, kann sie selbst eine akute Lungenschädigung auslösen oder bestehende pulmonale Beeinträchtigungen verstärken. Zentraler Schädigungsmechanismus ist die alveoläre Überdehnung durch hohe Tidalvolumina. Selbst bei der Anwendung kleiner, protektiver Tidalvolumina in Lungen mit einem nur geringen Anteil belüfteter Alveolen kann es in diesen zu alveolärer Überdehnung kommen. Diese führt einerseits zu mechanisch induzierter Apoptose sowie Nekrose und andererseits zu einer mechanisch induzierten Veränderung der Mediatorenfreisetzung hin zu einem pro-inflammatorischen Muster. Da der Transkriptionsfaktor NF- κ B zahlreiche Mediatoren aktiviert bzw. von ihnen beeinflusst werden kann, nimmt er in diesem Geschehen eine ganz besondere Schlüsselposition ein.

In der vorliegenden Arbeit soll nun der Hypothese nachgegangen werden, ob NF- κ B bei der mechanischen Dehnung und dem daraus resultierenden inflammatorischen Verhalten von pulmonalen Strukturzellen verändert exprimiert wird und inwieweit ein Zusammenhang zwischen Dehnung, Zellschädigung und NF- κ B besteht.

Dafür wurden sowohl frisch isolierte alveoläre Ratten-Typ-II Zellen, Zellen der human-alveolaren Epithelzelllinie A549 sowie Lungen- Fibroblasten der Zell-Linie Wi 38 untersucht. Alle drei Zellarten wurden auf einem speziellen elastischen Silikonboden von 6er Well-Platten inkubiert, wo sie mit Hilfe des Flexercell-Stretch-Gerätes (FX 3000) als Zellmonolayer equibiaxial gedehnt wurden.

Im Einzelnen sollen die folgenden Fragen untersucht werden:

- Reagieren die verschiedenen Zellarten unterschiedlich auf die mechanische Dehnung?
- Wird die NF- κ B - Aktivierung durch die mechanische Belastung beeinflusst und wie ändert sich die Konzentration von NF- κ B in den verschiedenen Zellarten durch die mechanische Beanspruchung?

- Welche Unterschiede gibt es zwischen physiologisch und unphysiologisch gedehnten Typ-II-Zellen im Vergleich zu den statischen Proben?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen NF- κ B-Veränderungen und Zellschädigung?

Als Parameter für die Zellschädigung wurde die LDH (Laktatdehydrogenase) mittels Spektralphotometer und NF- κ B per ELISA gemessen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Zur Isolierung, Aufarbeitung und Gewinnung der verschiedenen Zellarten (alveoläre Typ II – Zellen, A549 – Zellen und Wi-38 Zellen) waren unterschiedliche Materialien bzw. chemische Substanzen und Lösungen nötig.

3.1.1 Lösungen und Puffer

An dieser Stelle werden all jene Substanzen in alphabetischer Reihenfolge erwähnt, die zur Isolierung der alveolären Typ II – Zellen verwendet wurden.

Crystal – Violett – Lösung

Crystal – Violett	50 mg
Eisessig	0,5 ml
Aqua Dest.	100 ml

DNAse I-Lösung

DNAse (DNA - Desoxyribonukleinsäure)	0,002 g
With – Lösung	1,5 ml

Elastase – Lösung

Elastase	0,01 g
Trypsin	0,002 g
With - Lösung	40 ml

Nukleärer Lysis Puffer 1

Tris HCl 10 mM, pH 7,4	1 ml
MgCl ₂ 5 mM	1 ml
Aqua Dest	2 ml

Nukleärer Lysis Puffer 2

Tris HCl 10 mM, pH 7,4	1 ml
MgCl ₂ 5 mM	1 ml
NaCl 1 M	2 ml

Plattenbeschichtung

Fibronectin	100 µg/ml
-------------	-----------

Ratten IgG

Ratten IgG (Immunglobulin)	0,03 g
Tris – Puffer (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) 0,05 M, pH 9,4	40 ml

With – Lösung

Glucose	0,348 g	
0,9% NaCl	300 ml	
KCl 0,15 M	12 ml	1,116 g/100 ml
CaCl ₂ 0,11 M	6 ml	1,22 g/100 ml
MgSO ₄ 0,15 M	3 ml	3,7 g/100 ml
PO ₄ -Puffer 0,1 M, pH 7,4	9 ml	
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure)	18 ml	
0,2 M, pH 7,4		

Without – Lösung

Glucose	0,232 g
EGTA (Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-tetraessigsäure)	0,015 g
0,9% NaCl	200 ml
KCl 0,15 M	8 ml
PO ₄ -Puffer 0,1 M, pH 7,4	6 ml
HEPES-Puffer 0,2M, pH 7,4	12 ml

Zytosolischer Lysis Puffer

HEPES	50 mM
NaCl	200 mM
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	1 mM
EGTA	2,5 mM
Glycerin	10 %
Tween (Polysorbate) - 20	0,1 %
β - Glycerophosphat	10 mM
NaF (Natriumfluorid)	1 mM
Na ₃ VO ₄ (Trinatriumvanadatetrihydrat)	2 mM
DTT (Dithiothreitol)	1 mM
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	0,1 mM
Leupeptin	5 µg/ml

3.1.2 Kulturmedien

Jede Zellart benötigte individuelle Nährmedien zur Anlagerung und Reifung. Diese sind in ihrer Zusammensetzung im Folgenden dargestellt.

Dehnungsmedium AT II, A 549, Wi 38 – Zellen

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (farblos)	150 ml
FKS (2 %) (fetales Kälberserum)	3 ml
L - Glutamin	15 ml
Penicillin (Pen – Strep)	1,5 ml
Gentamicin	1,5 ml

Nährmedium AT II – Zellen

DMEM (farblos)	150 ml
FKS (10 %)	15 ml
L - Glutamin	15 ml
PIS (Pen – Strep)	1,5 ml

Gentamicin	1,5 ml
------------	--------

Nährmedium A549

RPMI	450 ml
Gentamicin / PIS 0,5 %	2,5 ml
FKS 10 %	50 ml

Nährmedium Wi 38 – Zellen

DMEM (mit Phenolrot)	450 ml
Gentamicin / PIS 0,5 %	2,5 ml
FKS 10 %	50 ml

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Material (alphabetisch)

Aqua Dest.
 Calciumchlorid
 DNase II
 DTT
 EDTA
 EGTA
 Elastase
 Glycerin 10 %
 HEPES 1M
 Kaliumchlorid
 Leupeptin
 Liquemin 25 000 iE
 Magnesiumchlorid
 Magnesiumsulfat
 Na_3VO_4
 NaCl
 NaCl – Lösung 0,9 %
 NaF 1 mM

Herstellerfirma

Delta Select (Dreieich, Dt.)
 Sigma – Aldrich (Steinheim, Dt.)
 Sigma – Aldrich (Steinheim, Dt.)
 Applichem (Darmstadt / Arheilgen, Dt.)
 ICN Biomedicals Inc (Warrenale, USA)
 Merck (Darmstadt, Dt.)
 EPC (Owensville, Missouri , USA)
 Merck (Darmstadt, Dt.)
 Gibco BRL (Karlsruhe, Deutschland)
 Merck (Darmstadt, Dt.)
 Applichem (Darmstadt / Arheilgen, Dt.)
 Roche (Mannheim, Dt.)
 Merck (Darmstadt, Dt.)
 Sigma – Aldrich (Steinheim, Dt.)
 Sigma – Aldrich (Steinheim, Dt.)
 Merck (Darmstadt, Dt.)
 Delta Select (Dreieich, Dt.)
 Merck (Darmstadt, Dt.)

PBS pH 7,4 (+CaCl ₂ ; MgCl ₂)	Gibco BRL (Karlsruhe, Deutschland)
PMSF	Applichem (Darmstadt / Arheilgen, Dt.)
PO ₄ - Puffer	Sigma – Aldrich (Steinheim, Dt.)
RPMI	Gibco BRL (Karlsruhe, Deutschland)
β - Glycerophosphat	Merck (Darmstadt, Dt.)
Tris - HCL	Sigma – Aldrich (Steinheim, Dt.)
Trypsin	Sigma – Aldrich (Steinheim, Dt.)
Tween – 20	Merck (Darmstadt, Dt.)

3.1.4 Zellkulturmaterial

Material (alphabetisch)

Bioflex – Plates 6 well
 Crystal - Violett
 D(+) - Glucose
 Deckgläschen 20x26
 DMEM (farblos)
 DMEM (mit Phenolrot)
 FKS
 Fibronectin
 L – Glutamin
 Neubauer Zählkammer 0,0025 mm²
 Penicillin/Streptomycin
 Rat IgG
 Safe – Lock Reaktionsgefäß 1,5ml
 Serological Pipette (steril) 10 ml
 Trypanblau
 Trypsin – EDTA
 Tube PP 15 ml
 Tube PP 50 ml
 Zellkulturschalen Ø100mm

Herstellerfirma

Dunn Labortechnik (Asbach)
 Sigma – Aldrich (Steinheim, Dt.)
 Sigma – Aldrich (Steinheim, Dt.)
 Menzel – Gläser (Braunschweig)
 Gibco BRL (Karlsruhe, Deutschland)
 Gibco BRL (Karlsruhe, Deutschland)
 Biochrom AG (Berlin, Dt.)
 Roche (Mannheim, Dt.)
 Gibco BRL (Karlsruhe, Deutschland)
 Optik – Labor (Balgach, Schweiz)
 Gibco BRL (Karlsruhe, Deutschland)
 Sigma – Aldrich (Steinheim, Dt.)
 Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Dt.)
 Sarstedt (Nümbrecht, Dt.)
 Gibco BRL (Karlsruhe, Deutschland)
 Gibco BRL (Karlsruhe, Deutschland)
 Sarstedt (Nümbrecht, Dt.)
 Sarstedt (Nümbrecht, Dt.)
 Falcon (Genf, Schweiz)

3.1.5 Geräte

Geräte	Herstellerfirma
CO ₂ - Inkubatoren	Hera Cell ; Heraeus, NAPCO (Kendro, USA)
Dehnmaschine, Flexercell Tension Plus System, FX - 3000	Dunn Labortechnik (Asbach)
Dehnpumpe	Edwards (Irvine, California, USA)
EIA – Platte 96 well	Flat bottom Costar, Bio Rad (Hercules, USA)
Eppendorf – Pipetten 0,5 – 2500 µl	Eppendorf Research (Wesseling-Berzdorf; Dt.)
Kühlschrank	Liebherr (Ochsenhausen, Dt.)
Megazentrifuge Rotina 46 R	Hettich (Tuttlingen)
Mikroskop (Wilovert S30)	hund / Wetzlar (Wetzlar, Dt.)
Minizentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus (Kendro, USA)
Siebgewebe / Filter (Polyamid Monofil) 15 µm, 20 µm, 100 µm	neoLab (Heidelberg, Dt.)
Spektral - Photometer	TECAN Spectra Classic (Austria)
Spritzen 10 ml ; Discardit II	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Dt.)
Sterilbank Microflow	NUNC (Nalge Nunc Intern) (Rochester, NY, USA)
Tiefkühlschrank	Liebherr (Ochsenhausen, Dt.)
Vortex - Gerät	Scientific – Industries (N.Y., USA)
Waage (Glaskasten)	Sartorius (Göttingen, Dt.)
Waage (offen)	Shinko Denski
Wasserbad	MEmmert, GmbH + Co KG (Schwabach)

3.1.6 Kommerzielle Assay`s

Zur LDH - Bestimmung wurde der Cytotoxicity Detection Kit von Roche (Penzberg) verwendet. Mit dem BCA Protein Assay Kit von Pierce (Rockford, IL) erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration. Der ELISA NF- κ B (human, mouse, rat) – Kit von Oxford Biomedical Research (Oxford, USA) diente der quantitativen Bestimmung von NF- κ B.

3.1.7 Zellen

Die alveolären Typ II – Zellen wurden aus der Lunge von männlichen Sprague Dawley Ratten isoliert. Die Zelllinie A549 (CCL-185) entstammt aus humanen alveolären Epithelzellen. Sowohl A549 als auch die humane Fibroblastenzelllinie (Wi 38) wurden bei ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA) kommerziell erworben.

3.2 Methoden

3.2.1 vorbereitende Maßnahmen

3.2.2.1 Isolierung der alveolären Typ II – Zellen (nach Dobbs et al.)

3.2.1.1.1 Versuchstiere

Die alveolären Typ II – Zellen wurden aus den Lungen männlicher Sprague Dawley Ratten gewonnen, welche ein Gewicht von 160 bis 200 g hatten und sechs bis sieben Wochen alt waren.

3.2.1.1.2. Narkose

Vor Beginn der Präparation der Tiere wurden alle mit einer Injektionsnarkose intraperitoneal mit acht Einheiten Narcoren und zwei Einheiten niedermolekulares Heparin anästhesiert. Das Heparin wurde zur schnelleren Wirksamkeit der Narkose beigefügt.

3.2.1.1.3 Präparation der Lunge

Die Ratte wurde auf dem eigens dafür vorbereiteten Operationstisch gelegt und nach dem Kneiftest, der zur Überprüfung der Narkose dient, mit Ethanol desinfiziert. Das Fell wurde großzügig am Bauch entfernt und anschließend das Peritoneum eröffnet. Nach dem Freilegen der Bauchgefäße, wurde die Aorta mit einer spitzen Schere eingeschnitten und sofort mit mehreren Tupfern abgedeckt. Anschließend wurde das Fell auch am Hals und Brustkorb der Ratte entfernt, um einen besseren Zugang zur Trachea zu ermöglichen und eine Kontamination weitestgehend auszuschließen. Unterhalb des Kehlkopfes erfolgte dann eine Tracheotomie und die Intubation mit einer Kanüle, welche mittels eines Zwirns an der Trachea fixiert wurde und so als Tubus diente. Danach wurde ein Pneumothorax durch Eröffnung des Zwerchfells verursacht. Nach anschließender Thorakotomie entlang des Sternums, wurden die Brustkorbteile mit Hilfe von Klammern für eine bessere Sicht auseinander gehalten.

Der Thymus und das linke Herzohr wurden entfernt, der rechte Ventrikel eingeschnitten und eine Infusionskanüle in die Arteria pulmonalis eingeführt.

Die Perfusion der Lunge zur Entfernung des Blutes erfolgte mit der „Without“ – Lösung (s. 3.1.1) durch frequente Ventilation mittels einer 10 ml Spritze, welche auf die Kanüle in der Trachea gesteckt wurde.

Unter größtmöglichen Perforationsschutz wurde nach makroskopischen Erweißen der Lunge erst das Herz und anschließend die Lunge mit Trachea und Kanüle entfernt.

3.2.1.1.4 Zellisolierung der Pneumozyten Typ II modifiziert nach Dobbs

Nach der Entfernung der Lunge aus dem Brustkorb wurde mit Hilfe von 10 ml Spritzen diese achtmal mit der „Without“ – und zweimal mit der „With“ – Lösung (s. 3.1.1) gespült. Anschließend wurde auf dem gleichen Wege 5 ml der Elastase – Lösung appliziert und die Lunge für 15 min in ein 37°C warmes NaCl - Wasserbad gehängt. Nach Ablauf der Zeit wurden weitere 35 ml der Elastase – Lösung innerhalb von 10 min über die Spritze (nun aber ohne Stempel) in die Lunge geführt - mit dem Ziel, die Pneumozyten aus dem Gewebe herauszulösen. Im Anschluss daran folgte in einem 50 ml Becher die Entfernung der Trachea sowie der Kanüle mittels Mince - Schere, die Hinzugabe der DNase – Lösung (s. 3.1.1) und Auffüllung mit 10 ml der „With“ – Lösung sowie die Zerkleinerung der Lunge in ca. 1 mm³ große Stückchen. Die Suspension wurde nachfolgend in einen Erlenmeyerkolben mit 5 ml FBS gegeben und zwei Minuten vorsichtig geschüttelt. Daraufhin erfolgte das Filtrieren der Suspension mit Siebgewebe unterschiedlicher Porengröße – 100 µm, 20 µm, 15 µm und das Sammeln in einem 50 ml Tube.

Die nun folgenden Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank (NUNC) statt. Dort diente die Herstellung von einem 1:4 Gemisch aus Zellsuspension und Crystal – Violet, welches in eine Neubauerzählkammer appliziert wurde, der Bestimmung von Zellzahl vor Adhärenz. Wobei 100 gezählte Zellen 1.000.000 Zellen pro ml entsprechen. Währenddessen wurde der Tube mit der restlichen Zellsuspension bei 1100 U / min, +4°C und 5 min lang zentrifugiert (Rotina 46R, Hettich). Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt und das entstandene Pellet mit 20 ml Nährmedium (10 % FBS) resuspendiert. Hierauf erfolgte die

Gabe von jeweils 10 ml der resuspendierten Zellsuspension auf die beiden vorbereiteten mit IgG-beschichteten Platten und die Inkubation für 10 min im CO₂ – Inkubator (bei 37°C), mit dem Ziel, einer Adhärenz nicht benötigter Zellen (vor allem Fc-Rezeptor positive Monozyten und Makrophagen). Anschließend wurde die Zellsuspension wieder in eine 50 ml Tube gefüllt und die Schalen mit 5 ml DMEM nachgewaschen. Von der erhaltenen Zellsuspension fand erneut die Bestimmung der Zellzahl mittels Crystal-Violett und Neubauerzählkammer (wie oben beschrieben) statt. Die Zellen wurden danach erneut nach gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand wieder abgesaugt und das Pellet mit DMEM-Nährmedium (10 % FBS) resuspendiert, wobei die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt wurden. Danach erfolgte die Verteilung der Zellen auf die am Vortag mit Fibronectin beschichteten 6-well Silikonmembranen (Bioflex plates); 1 ml pro well. Zum Schluss wurden die Platten für 24 Stunden in den CO₂ – Inkubator gestellt, damit sich die Zellen an die Membranen anlagern konnten.

3.2.1.2 Zellkultivierung der A 549- und Wi 38 – Zellen

Beide Zellarten wurden bei der Kultivierung gleich behandelt, welche unter sterilen Bedingungen (Microflow, Biological Safety Cabinet, NUNC) durchgeführt wurde. Die Zellen wurden bei 37°C, 6 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank gehalten.

Sowohl die A 549- wie auch Wi 38 Zellen wurden auf Zellkulturschalen (Ø 150 mm) in einem speziellen Nährmedium (s. 3.1.2) kultiviert, welches regelmäßig abgesaugt und erneuert wurde (ca. alle 3-4 Tage). Für die Experimente wurden die Zellen geerntet, gezählt und definiert ausgesät. Nach Absaugen des Mediums wurden die 15cm-Zellkulturschalen mit 20 ml PBS gespült und anschließend, nach Entfernen des PBS, 4 ml Trypsin aufgetragen, um die angelagerten Zellen zu lösen. Zur Unterstützung dieses Vorgangs wurde die Zellkulturschale für einige Minuten in den Brutschrank (37°C) gestellt. Mit 6 ml Medium (RPMI, 10% FBS) wurde die Reaktion gestoppt und die Zellsuspension konnte in eine 50 ml Tube pipettiert werden. Nun wurden die Zellen gezählt. Dazu wurde ein 1:4 Gemisch aus Zellsuspension und Trypanblau hergestellt, welches in eine Neubauerzählkammer appliziert wurde, um die genaue Zellzahl unter dem Mikroskop zu bestimmen. Im Anschluss daran wurden

10^6 Zellen pro ml auf zwei Dehnplatten (Bioflex plates) verteilt (1.Mill. oder 10^6 Zellen pro well). Zum Schluss wurden die Platten für 24h in den CO₂ – Inkubator gestellt, damit sie sich an die Membranen anlagern konnten.

3.2.1.3 Mechanische Dehnung der Zellen in der Dehnmaschine

Nach 24 h im CO₂ – Inkubator hatten sich sowohl die Pneumozyten Typ II wie auch die A549 – und Wi 38 – Zellen an die Silikonmembranen angelagert und konnten nun gedehnt werden (Flexercell, Dunn Lab). Dazu wurde das alte Nährmedium abgesaugt und durch frisches (2 % FBS – Anteil) ersetzt (3 ml / well). Danach konnten bis zu 4 Platten gleichzeitig gedehnt werden, wobei stets mindestens eine Platte zum späteren Vergleich als statische Kontrolle im Brutschrank verweilte. Man konnte verschiedene Dehnmuster in Abhängigkeit von Stärke und Frequenz einstellen. Berechnet wurden die Parameter nach dem Prinzip von Tschumperlin und Margulies, 1998. Wobei sich auf der einen Seite für eine physiologische Dehnung (Atemfrequenz 20/min und 15 % Änderung der Oberfläche [D – 20/15]) und auf der anderen Seite für eine mit erhöhter Frequenz und Amplitude (D – 40/30) entschieden wurde. Die Dauer der Dehnung war von der zu untersuchenden Fragestellung abhängig und wird bei den einzelnen Versuchen und Ergebnissen separat angegeben.

Im Folgenden ist das Gerät zur Dehnung dargestellt. Es besteht aus den Dehnplatten, dem Verbindungsglied und der Kontrollstation bzw. Steuerelement, an dem Dehnstärke (Amplitude) und -frequenz genau eingestellt werden konnten (Abb.6 und 7).



Abb.6: Flexcell® Tension Plus™ System (FX-3000™)

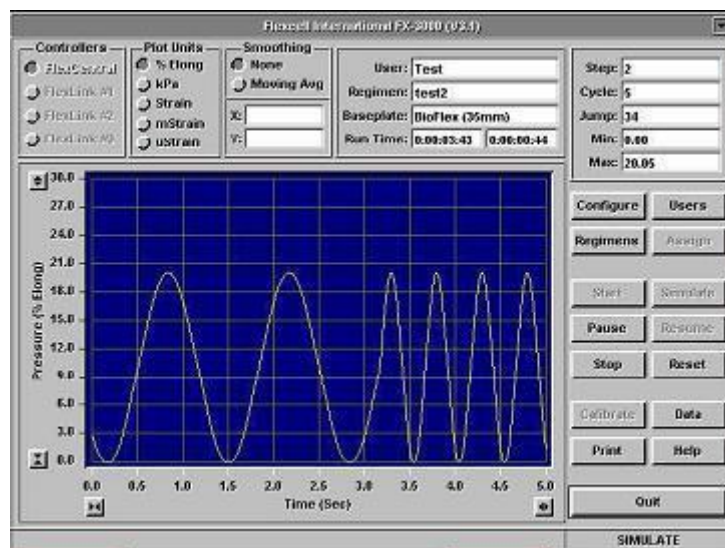


Abb. 7: grafische Darstellung der Dehnampitude und –frequenz

3.2.1.4 Aufarbeitung der Proben

Nach der Dehnung wurde unter weiterhin sterilen Bedingungen der Überstand der Bioflex plates - sortiert nach statisch und gedehnt - in 15 ml Tubes pipettiert, welche 5 Minuten bei 1100 U / min sowie 4°C zentrifugiert wurden. Anschließend wurde wiederum der Überstand in neue 15 ml Tubes pipettiert, mit Versuchsnummer sowie Dehnmuster beschriftet und für die noch folgende LDH - Bestimmung vorerst im Kühlschrank aufbewahrt.

Die während der eben beschriebenen Prozedur unter der Sterilbank verbliebenen Bioflex plates wurden nun gleichmäßig mit PBS gespült und nach Entfernen des PBS ca. 1 ml Trypsin pro well auf den Silikonmembranen verteilt. Nach einem ca. 10 minütigen Aufenthalt im Brutschrank, welcher den Vorgang des Ablösens der Zellen von der Membranoberfläche beschleunigen sollte, wurde dies mikroskopisch kontrolliert und bei positivem Ergebnis (Zellen haben sich von der Membran gelöst) durch Zugabe von Nährmedium (1 ml pro well) beendet. Anschließend wurden die Zellen von den Wells (getrennt nach gedehnt und statisch) in zwei 50 ml Tubes pipettiert. Diese wurden im Anschluss wieder bei 1100 U / min und 4°C 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen mit einer definierten Menge PBS resuspendiert (500µl pro 3 well). Anschließend wurde die Zellsuspension auf 1,5 ml Tubes verteilt (500µl pro Tube). Die Zellen wurden erneut unter den genannten Bedingungen abzentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und die gewonnenen Pellets wurden bei -20°C im Tiefkühlschrank bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.1.5 Herstellung der zytosolischen und nukleären Extrakte

Der zytosolische Lysispuffer (ZLP, s. 3.1.1) ist ein Western - Blot Lysispuffer zur Permeabilisierung der Zellmembran. Der Puffer für die nukleären Lysate wurden nach Angaben von Davis et al. (2001) hergestellt.

Als erstes wurde auf jedes Pellet 200 µl des ZLP pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde auf Eis, wurden die Proben 15 min lang bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand bildete das zytosolische Extrakt, wel-

ches nun vorsichtig in ein neues 1,5 ml Eppendorf – Tube pipettiert wurde. Das verbleibende Pellet wurde mit 50 µl des Puffer 1 und 50 µl des Puffer 2 (P1 und P2 = nukleärer Lysispuffer, [NLP]) resuspendiert und diesmal nur 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der nach dem Zentrifugieren (15 min, bei 4°C, 13000 U / min) entstandene Überstand bildete das nukleäre Extrakt, zu welchem nach Überführung in ein neues 1,5 ml Tube 25 µl Glycerol hinzugegeben wurde (Endkonzentration des Glycerols 20%).

3.2.2 LDH – Bestimmung (Kit von Roche)

In den Überständen der Proben (gedehnte und statische Zellen) wurden, bevor sie bei -20°C eingefroren wurden, der LDH – Wert mit dem Cytotoxicity Detection Kit von Roche bestimmt.

Dazu wurden 100 µl jeweils des gedehnten und des statischen Überstandes in einem Dreifachansatz auf eine 96-well-Platte pipettiert, ebenso die Standardreihe (Einfachansatz) sowie der Leerwert (Dreifachansatz). Dann wurde ein Gemisch aus Catalyst (79 µl) und Deysolution (3,55 ml) hergestellt, von diesem 100 µl auf jedes Well pipettiert wurde, welches Standardlösung, Leerwerte (Dehnmedium) und Proben enthielt. Danach wurde die 96-well-Platte bei Raumtemperatur für 30 Minuten ins Dunkle gestellt und anschließend die LDH – Konzentration mit einem Spektralphotometer (Tecan) bei einer Wellenlänge von 492 nm bestimmt.

3.2.3 Proteinbestimmung (nach Pierce)

Die Bestimmung des Proteingehaltes in den zellulären und nukleären Extrakten wurde mit dem BCA Protein Assay Kit von Pierce durchgeführt. Dazu wurden die Proben 1:10 mit PBS verdünnt (5µl Probe und 45 µl PBS) und anschließend 10 µl jeder verdünnten Probe auf eine 96-well-Platte in einem Dreifachansatz pipettiert. Danach wurden 200 µl des frisch zubereiteten Working Reagent zu allen Proben hinzugegeben. Die Platte wurde anschließend in einem Brutschrank bei 37 °C 30 Minuten inkubiert. Zum Abschluss wurde der in den Extrakten enthaltene Proteinwert mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 560 nm bestimmt.

3.2.4 NF- κ B Bestimmung mittels ELISA

Die NF- κ B Bestimmung in den zellulären und nukleären Extrakten erfolgte mittels eines spezifischen ELISAs von Oxford Biomedical Research. Der ELISA beruht auf der Bindung von Oligonukleotiden an die NF- κ B – Spaltprodukte p50 und p105, wodurch nur die Konzentration von aktiviertem (gespaltenem) NF- κ B bestimmt wurde. Der primäre Antikörper bindet wiederum an die p50 Untereinheit des NF- κ B, welche durch die DNA gebunden wurde. Die Detektion der Bindung des primären Antikörpers erfolgte dann mit einem Spezies-spezifischen Sekundärantikörper, der Enzym (HRP)-gekoppelt war. Durch Zugabe von Substratlösung wurde eine Farbreaktion ausgelöst. Die gemessenen Werte konnten durch Abgleich mit den Werten einer definierten Standardreihe von p50 in pg/ml angegeben werden. Durch die Verrechnung mit den Proteinkonzentrationen in den Lysaten wurde letztendlich die Konzentration von aktiviertem NF- κ B in pg NF- κ B / mg Protein angegeben.

Die Durchführung erfolgte nach einer mitgelieferten Vorschrift und ist im Folgendem kurz dargestellt: 60 μ l des activated NF- κ B Binding Buffer-Gemisches, mit der darin enthaltenen DNA, wurden auf jedes Well der mit Oligonukleotiden beschichteten Platte gegeben. Dazu wurden 40 μ l der Standard-Reihe, des Leerwertes (Dilution Buffer) und der Proben pro Well pipettiert. Dann folgte eine Inkubationszeit bei Raumtemperatur von zwei Stunden. Danach fand die mehrfache Spülung der Platte mit 200 μ l Waschpuffer statt (5x2 min). Zum Schluss wurde die Platte auf ein sauberes Tuch ausgeklopft bis sie trocken war. Nun wurden 100 μ l von dem gelösten spezifischen bzw. primären Antikörper auf jedes Well pipettiert und die Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend erfolgte wieder die Spülung mit 200 μ l Waschpuffer wie oben beschrieben. Danach kamen 100 μ l vom gelösten sekundären Antikörper (Enzym Konjugat) auf jedes Well und wieder schloss sich eine Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur an. Dieser Prozedur folgte erneut die Behandlung der 96-well-Platte mit Waschpuffer. Am Ende wurden 100 μ l vom Colorimetric Substrate auf jedes Well pipettiert und die Platte 30 bis 45 Minuten inkubiert bis sich eine blaue Färbung einstellte. Nun wurde die Reaktion mit 50 μ l 5 N Schwefelsäure und 50 μ l destiliertem Wasser (Aqua dest.) gestoppt. Die Farbe wechselte jetzt von blau zu gelb. Schließlich wurde die optische Dichte (OD-

Werte) bei 450 nm mittels Spektralphotometer berechnet und die Konzentration des aktivierten NF- κ Bs durch Einordnen der Messwerte in eine Eichkurve mittels EASY-Fit-Software bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis der nukleären Lysate

Da die Lactatdehydrogenase (LDH) nur im Cytoplasma vorkommt und nicht im Zellkern, wurde der LDH-Bestimmungskit von Roche auch zur Überprüfung der cytosolischen und nukleären Lysate verwendet (Hirsch-Hoffmann et al. 1964). Der LDH – Gehalt wurde sowohl in den cytosolischen wie auch in den nukleären Extrakten der AT II-, A549- und Wi 38 – Zellen in drei verschiedenen Versuchen ($n = 3$) gemessen, um die erfolgreiche Trennung der Lysate zu kontrollieren.

Dabei ergab sich, dass ausschließlich in den cytosolischen Extrakten LDH nachgewiesen werden konnte und somit die nukleären Extrakte keine cytosolischen Verunreinigungen aufwiesen.

4.2 Laktatdehydrogenase (LDH)

Die LDH - Freisetzung wurde als Marker für einen zytotoxischen Zellschaden ermittelt und die LDH – Konzentration in den Überständen aller Versuche der AT II-, A549- und Wi 38 – Zellen nach 24stündiger Dehnung und bei den statischen Kontrollen gemessen.

4.2.1 Physiologische Dehnung der AT II-, A549- und Wi 38 – Zellen

Alle Zellarten wurden mit einer Frequenz von 20/min und einer 15% Änderung der Oberfläche (D 20-15) gedehnt. Das entspricht einer mechanischen Belastung bei physiologischer Atmung.

Dabei ergab sich bei den alveolären Typ-II-Zellen ein signifikanter Anstieg der LDH – Konzentration von $0,077 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$ auf $0,219 \pm 0,105 \mu\text{g/ml}$ ($p \leq 0,05$).

Bei den A 549 – Zellen kam es zu keinem wesentlichen Unterschied zwischen den statischen und gedehnten Kulturen (stat: $0,124 \pm 0,026 \mu\text{g/ml}$; ged: $0,160 \pm 0,028 \mu\text{g/ml}$).

Hingegen konnte auch bei den Fibroblasten ein signifikanter Anstieg der LDH - Konzentration bei physiologischer Dehnung beobachtet werden (stat: $0,154 \pm 0,023$ µg/ml; ged: $0,247 \pm 0,059$ µg/ml) ($p \leq 0,05$) (s. Abb. 8).

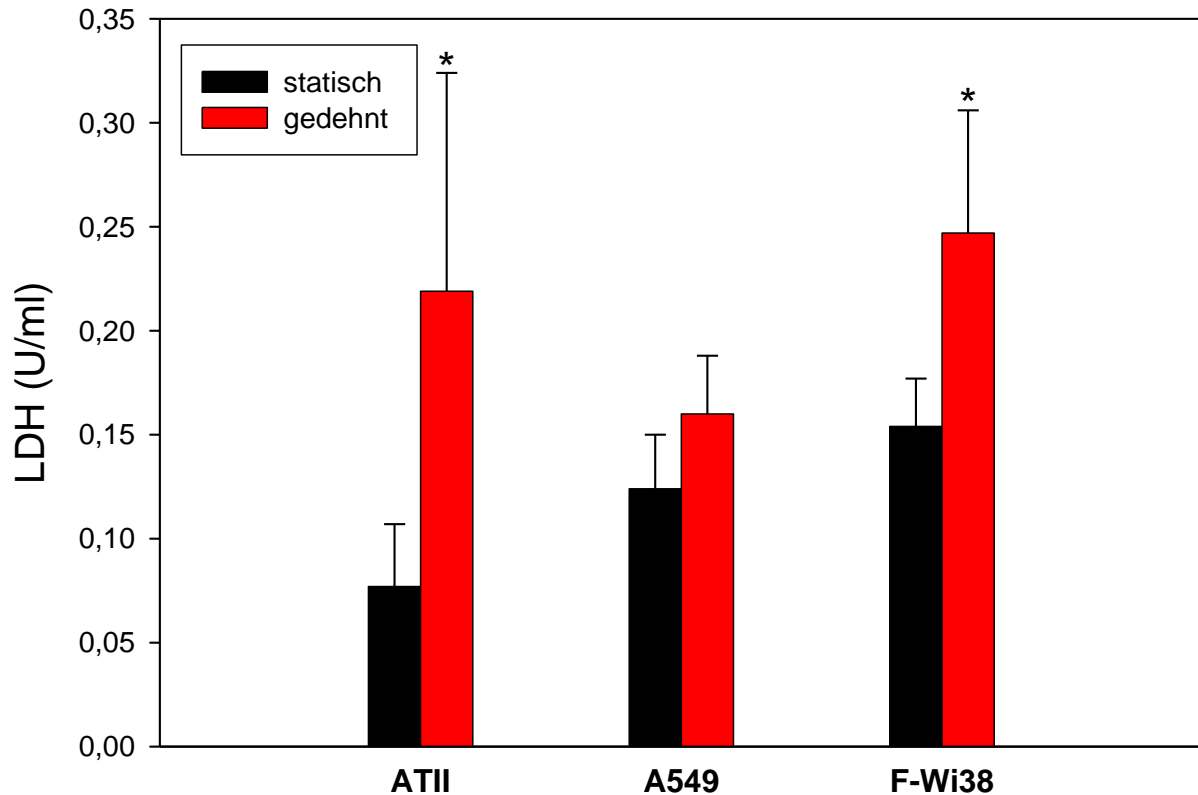


Abb. 8: Mittelwerte der LDH – Konzentration bei einer physiologischen 20-15 Dehnung:

Alle Zellarten wurden mit einer Frequenz von 20/min und einer 15%igen Änderung der Oberfläche (D 20-15) 24 Stunden gedehnt. Anschließend wurde die Konzentration der LDH in den Überständen der Proben mittels Kit photometrisch gemessen.

AT II- Zellen (n=6); A549-Zellen (n=6) und F-Wi38-Zellen (n=8)

** Signifikanz bei $p \leq 0,05$*

4.2.2 Unphysiologische Stimulation der AT II-, A549- und Wi 38 – Zellen

Alle Zellarten wurden mit einer Frequenz von 40/min und einer 30%igen Änderung der Oberfläche (D 40-30) gedehnt. Das entspricht einer mechanischen Belastung bei pathologischer Atmung.

Dabei ergab sich bei den alveolären Typ-II-Zellen ein signifikanter Anstieg der LDH – Konzentration von $0,077 \pm 0,079 \mu\text{g/ml}$ auf $0,332 \pm 0,235 \mu\text{g/ml}$ ($p \leq 0,01$).

Bei den A 549 – Zellen kam es ebenfalls zu einem wesentlichen Unterschied zwischen den statischen und gedehnten Kulturen (von $0,104 \pm 0,037 \mu\text{g/ml}$ auf $0,360 \pm 0,183 \mu\text{g/ml}$) ($p \leq 0,05$).

Ebenso konnte auch bei den Fibroblasten ein signifikanter Anstieg der LDH - Konzentration bei unphysiologischer Dehnung beobachtet werden (von $0,172 \pm 0,015 \mu\text{g/ml}$ auf $0,345 \pm 0,113 \mu\text{g/ml}$) ($p \leq 0,05$).

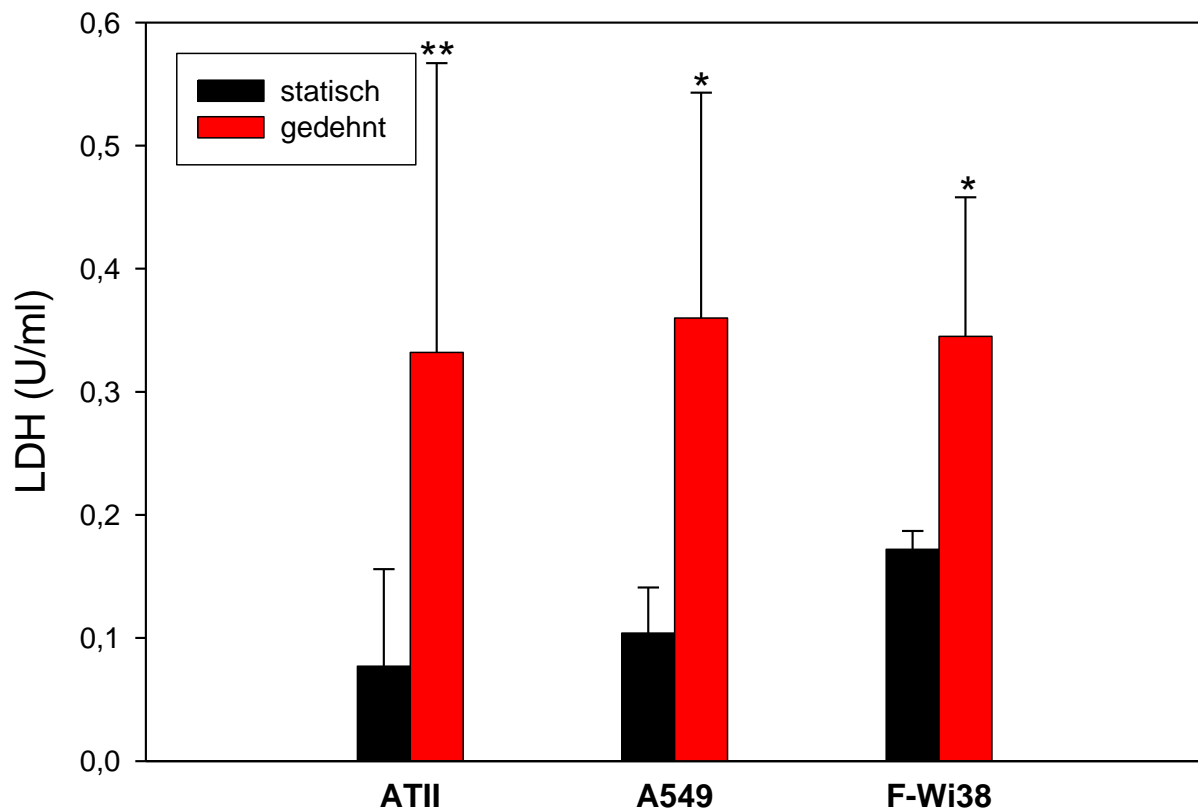


Abb. 9: Mittelwerte der LDH – Konzentration bei einer pathologischen 40-30 Dehnung:

Alle Zellarten wurden mit einer Frequenz von 40/min und einer 30%igen Änderung der Oberfläche (D 40-30) 24 Stunden gedehnt.

AT II- Zellen (n=22); A549- Zellen (n=15) und F-Wi38-Zellen (n=13)

****** Signifikanz bei $p \leq 0,01$

***** Signifikanz bei $p \leq 0,05$

4.3 Transkriptionsfaktor NF- κ B

4.3.1 Expression in den cytosolischen Extrakten der AT II-, A549- und Wi 38 - Zellen

In den cytosolischen Extrakten der AT II-Zellen kam es bei der physiologischen Dehnung (D- 20/15) zu einem leichten, aber nicht signifikanten Anstieg von NF- κ B in den gedehnten Lysaten im Vergleich zu den statischen Kontrollproben (stat: $3,232 \pm 1,638$ pg/mg Protein, ged: $5,333 \pm 5,341$ pg/mg).

Auch bei den A549-Zellen wurde ein Anstieg von NF- κ B (nicht signifikant) bei einer Frequenz von 20/min und einer 15% Änderung der Oberfläche beobachtet (stat: $12,664 \pm 4,011$ pg/mg, ged: $19,690 \pm 9,943$ pg/mg).

Ein nicht signifikanter Anstieg von NF- κ B konnte auch in den cytosolischen Extrakten der Wi 38-Zellen bei einem 20/15 Dehnungsmuster festgestellt werden (stat: $14,737 \pm 7,781$ pg/mg, ged: $19,800 \pm 13,860$ pg/mg).

Dargestellt sind die Ergebnisse der cytosolischen NF- κ B-Messungen bei physiologischer Dehnung (Frequenz von 20/min und einer 15% Änderung der Oberfläche) in Abbildung 10.

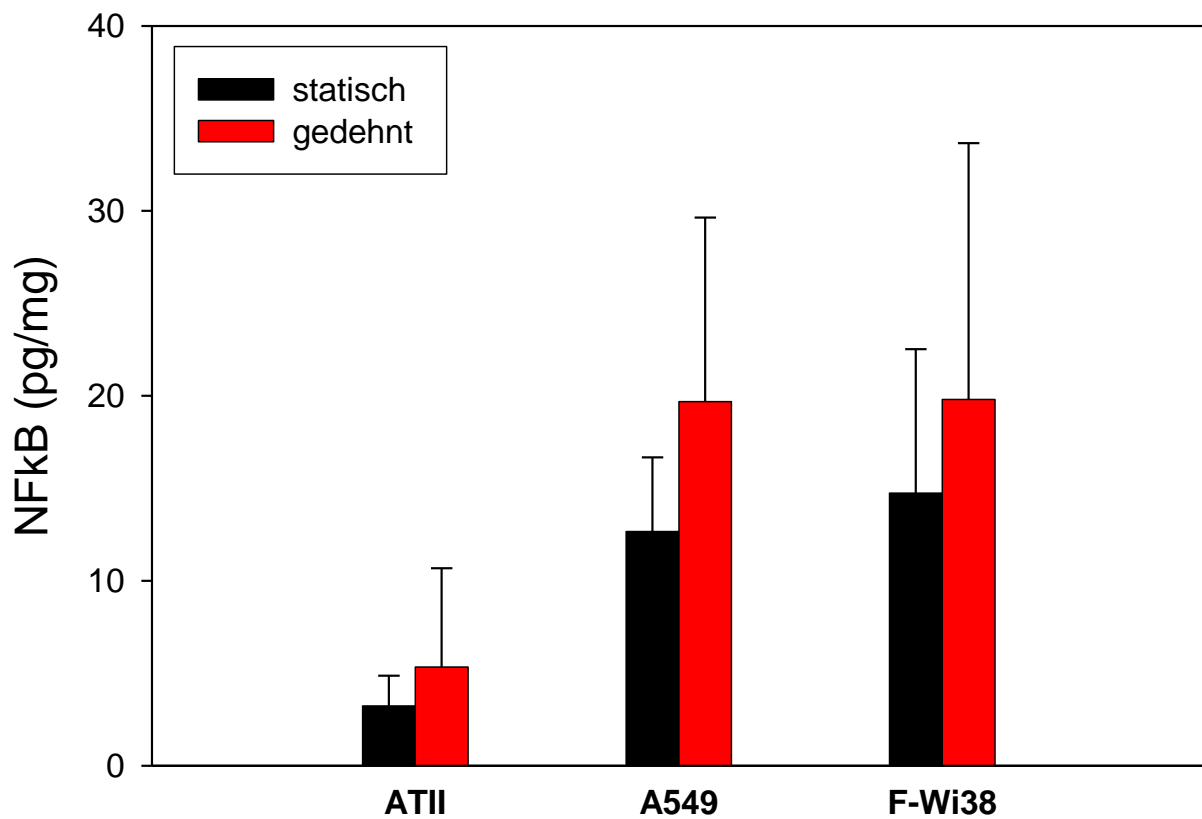


Abb. 10: Mittelwerte der NF-κB Konzentrationen in den cytosolischen Extrakten bei einer 20-15 Dehnung:

Eingefrorene Zellpellets, die 24 Stunden nach dem 20/15 Dehnungsmuster gedehnt wurden, wurden lysiert und aktiviertes NF-κB mittels Elisa photometrisch in cytosolischen Extrakten gemessen.

ATII-Zellen (n=7); A549-Zellen (n=5); F-Wi38-Zellen (n=7)

Bei unphysiologischer Dehnung (D- 40/30) der AT II-Zellen kam es in den cytosolischen Lysaten zu keinem signifikanten Anstieg von NF- κ B in den gedehnten Lysaten im Vergleich zu den statischen Kontrollproben (stat: $1,804 \pm 0,784$ pg/mg Protein, ged: $2,477 \pm 1,217$ pg/mg).

Auch bei den A549-Zellen wurde keine Veränderung von NF- κ B bei einer Frequenz von 40/min und einer 30% Änderung der Oberfläche beobachtet (stat: $22,978 \pm 10,907$ pg/mg, ged: $22,396 \pm 12,128$ pg/mg).

Ebenso konnte auch in den cytosolischen Extrakten der Wi 38-Zellen keine Differenz zwischen gedehnten und statischen Proben in Bezug auf die Konzentration von aktivierten NF- κ B bei einem 40/30 Dehnungsmuster festgestellt werden (stat: $25,822 \pm 12,443$ pg/mg, ged: $25,274 \pm 18,602$ pg/mg).

Dargestellt sind die Ergebnisse der cytosolischen NF- κ B-Messungen bei unphysiologischer Dehnung (Frequenz von 40/min und einer 30% Änderung der Oberfläche) in Abbildung 11.

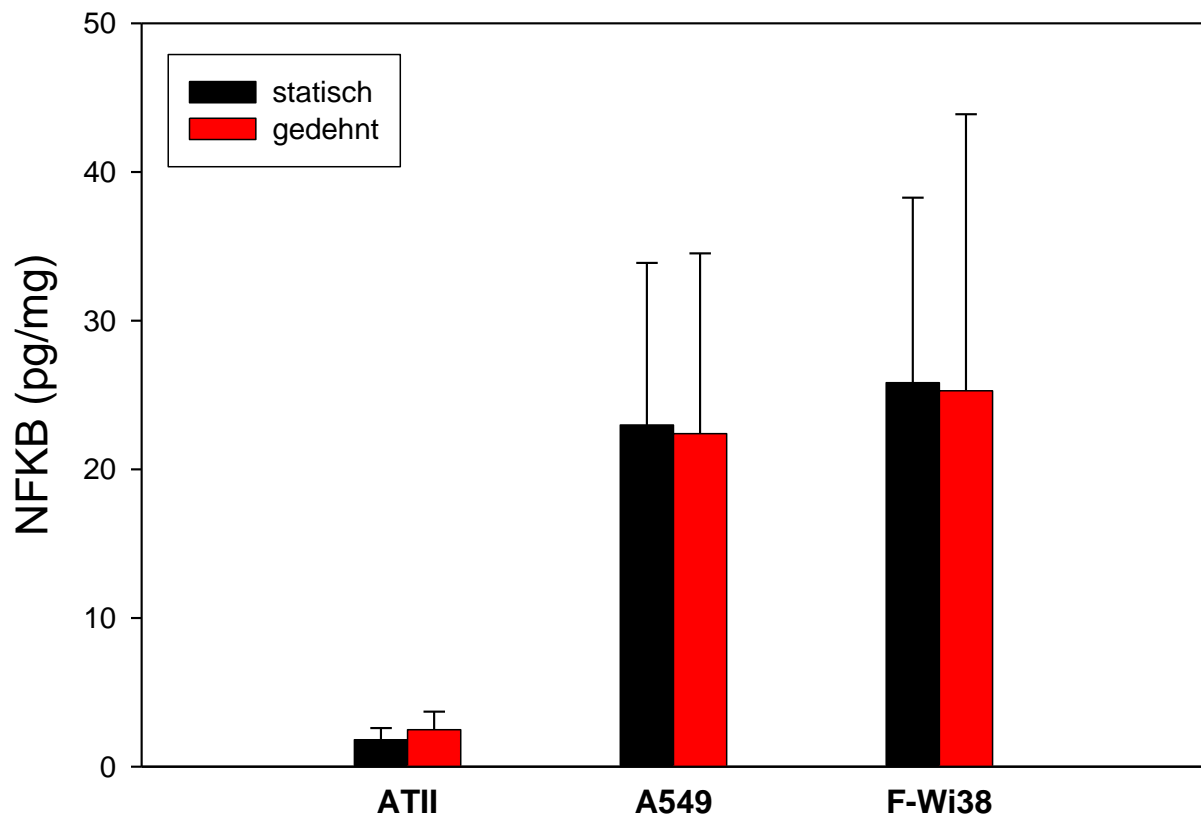


Abb.11: Mittelwerte der NF-κB Konzentrationen in den cytosolischen Extrakten bei einer 40-30 Dehnung:

Die Bestimmung von aktiviertem NF-κB in 24 Stunden gedehnten cytosolischen Zelllysaten nach dem 40/30 Dehnungsmuster, erfolgte ebenfalls mittels Elisa.

ATII-Zellen (n=9); A549-Zellen (n=11); F-Wi38-Zellen (n=11)

4.3.2 Expression in den nukleären Extrakten der AT II-, A549- und Wi 38 – Zellen

a) Physiologische Dehnung

In den nukleären Extrakten der AT II-Zellen kam es bei der physiologischen Dehnung (D- 20/15) ausgehend von einer viel höheren Konzentration von aktivierten NF- κ B im Zellkern (im Vergleich zum Cytoplasma) dennoch zu keinem Anstieg oder zu einer Verringerung von NF- κ B in den gedehnten Lysaten im Vergleich zu den statischen Kontrollproben (stat: $9,562 \pm 3,659$ pg/mg Protein, ged: $10,810 \pm 4,542$ pg/mg).

Bei den A549-Zellen wurde allerdings eine leichte Zunahme (nicht signifikant) von NF- κ B bei einer Frequenz von 20/min und einer 15% Änderung der Oberfläche beobachtet (stat: $11,792 \pm 3,128$ pg/mg, ged: $16,802 \pm 8,419$ pg/mg).

In den nukleären Lysaten der Wi 38-Zellen bei einem 20/15 Dehnungsmuster konnte wie bei den AT-II-Zellen keine Differenz zwischen statischen und gedehnten Proben festgestellt werden (stat: $16,451 \pm 7,285$ pg/mg, ged: $16,274 \pm 5,297$ pg/mg).

Dargestellt sind die Ergebnisse der nukleären NF- κ B-Messungen bei physiologischer Dehnung (Frequenz von 20/min und einer 15% Änderung der Oberfläche) in Abbildung 12.

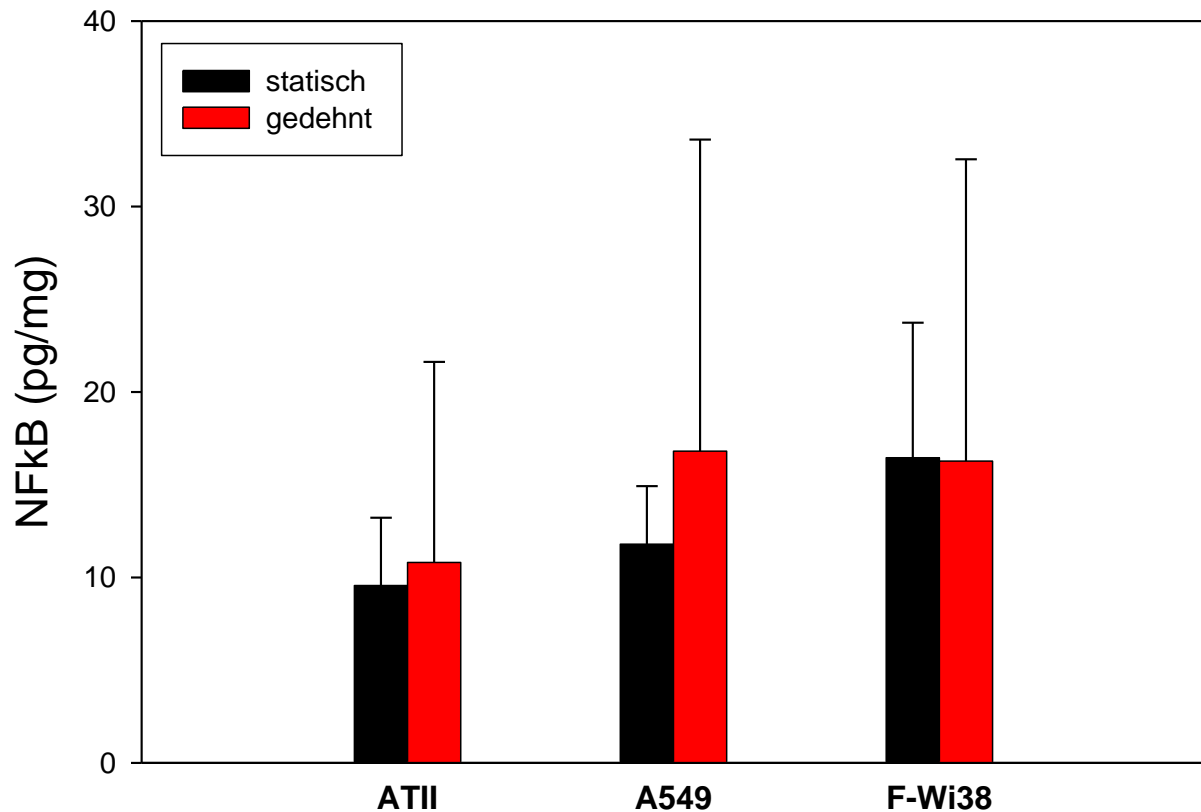


Abb.12: Mittelwerte der NF- κ B Konzentrationen in den nukleären Extrakten bei einer 20-15 Dehnung:

Die bereits lysierten Pellets wurden nach Probeentnahme zur NF- κ B-Bestimmung im Cytoplasma zentrifugiert und die entstandenen Pellets mit einem anderen zellkern-membrandestruierenden Lysispuffer erneut lysiert. In den nun nukleären Extrakten wurde aktiviertes NF- κ B ebenfalls mit dem gleichen Elisa von Oxford Biomedical Research photometrisch gemessen.

ATII-Zellen (n=5); A549-Zellen (n=5); F-Wi38-Zellen (n=7)

b) Unphysiologische Dehnung

In den nukleären Extrakten der AT II-Zellen kam es bei der unphysiologischen Dehnung (D- 40/30) ausgehend von einer viel höheren Konzentration von aktivierten NF- κ B im Zellkern (s.o.) zu einem massiven Anstieg von aktiviertem NF- κ B in den gedehnten Lysaten im Vergleich zu den statischen Kontrollproben ($p=0,072$) (stat: $9,308 \pm 5,203$ pg/mg Protein, ged: $22,701 \pm 12,925$ pg/mg).

Bei den A549-Zellen wurde eine Verringerung von NF- κ B (nicht signifikant) bei einer Frequenz von 40/min und einer 30% Änderung der Oberfläche beobachtet (stat: $24,328 \pm 15,643$ pg/mg, ged: $17,274 \pm 13,827$ pg/mg).

In den nukleären Lysaten der Wi 38-Zellen bei einem 40/30 Dehnungsmuster konnte wie bei der unphysiologischen Dehnung der Fibroblasten keine Differenz von NF- κ B zwischen statischen und gedehnten Proben festgestellt werden (stat: $11,984 \pm 4,433$ pg/mg, ged: $14,952 \pm 9,033$ pg/mg).

Dargestellt sind die Ergebnisse der nukleären NF- κ B-Messungen bei unphysiologischer Dehnung (Frequenz von 40/min und einer 30% Änderung der Oberfläche) in Abbildung 13.

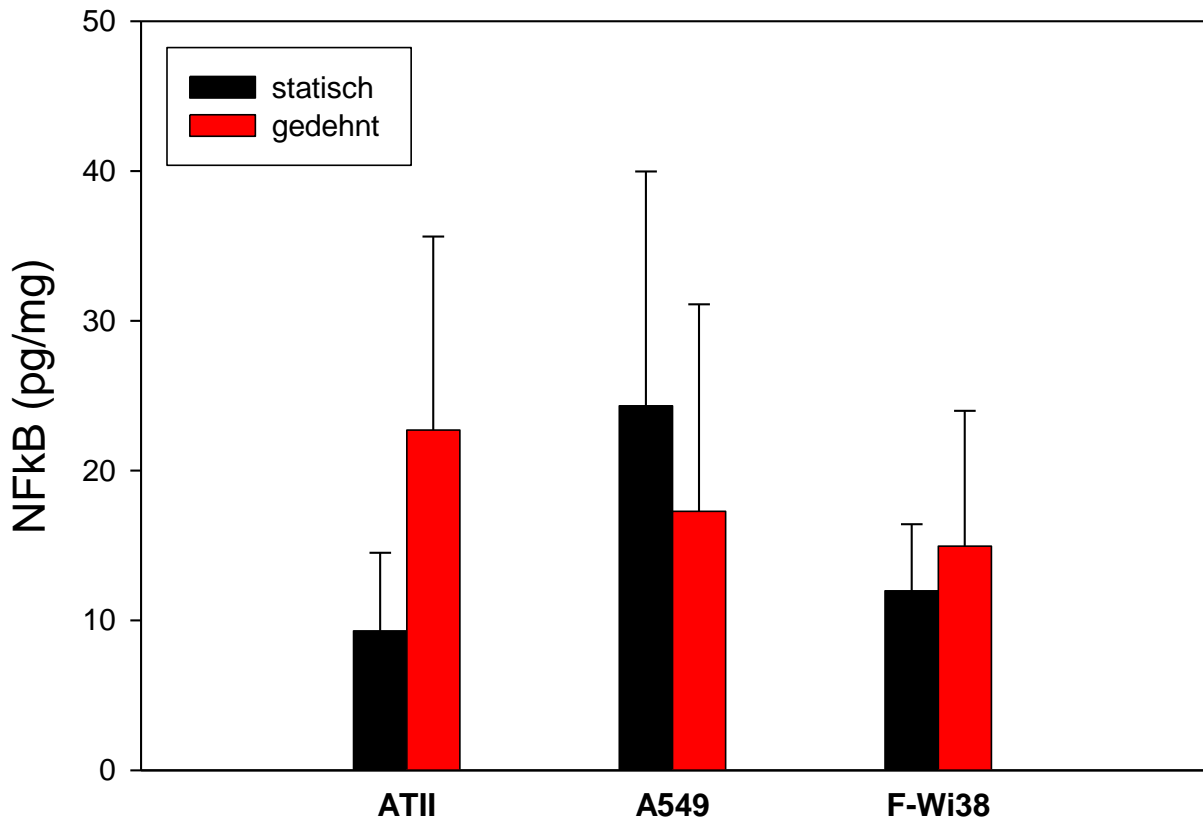


Abb.13: Mittelwerte der NF- κ B Konzentrationen in den nukleären Extrakten bei einer 40-30 Dehnung:

Die Bestimmung von aktiviertem NF- κ B in 24 Stunden gedehnten nukleären Zelllysaten nach dem 40/30 Dehnungsmuster, erfolgte ebenfalls mittels Elisa.

ATII-Zellen (n=7); p=0,072; A549-Zellen (n=10); p= 0,275; F-Wi38-Zellen (n=5) (nicht signifikant)

4.4 Kinetik der NF- κ B – Expression bei AT II-, A549- und Wi 38 – Zellen

Die Messung von aktiviertem NF- κ B erfolgte aus Proben, die 24 Stunden lang gedehnt wurden. Um nun herauszufinden, ob NF- κ B zu einem früheren Zeitpunkt der mechanischen Belastung mehr aktiviert bzw. mehr inaktives in aktiviertes umgewandelt wurde als nach 24 Stunden, erfolgte die Untersuchung der Kinetik der NF- κ B – Expression bei AT II-, A549- und Wi 38 – Zellen.

Bei allen drei Zellarten wurde die NF κ B - Aktivierung durch erhöhte mechanische Belastung (D – 40/30) bei 1h, 2h, 4h und 24h gemessen und zusammen mit nicht gedehnten Proben (Messung bei 0h) in einem Verlaufsdiagramm dargestellt.

4.4.1 Alveoläre Typ – II – Zellen

Dabei ergab sich, dass es bei den alveolären Typ-II-Zellen in den cytosolischen Extrakten auch nach 24 h zu keinem signifikanten Anstieg der aktivierten NF κ B - Konzentration kommt. Wohingegen in den nukleären Lysaten nach 4h ein Maximum beobachtet werden konnte.

Zeit	Aktiviertes NFκB im Cytosol (pg/mg Protein)	Aktiviertes NFκB im Zellkern (pg/mg Protein)
0h	1,8	1,02
1h	1,21	0,96
2h	2,04	3,45
4h	2,07	16,76
24h	2,15	5,43

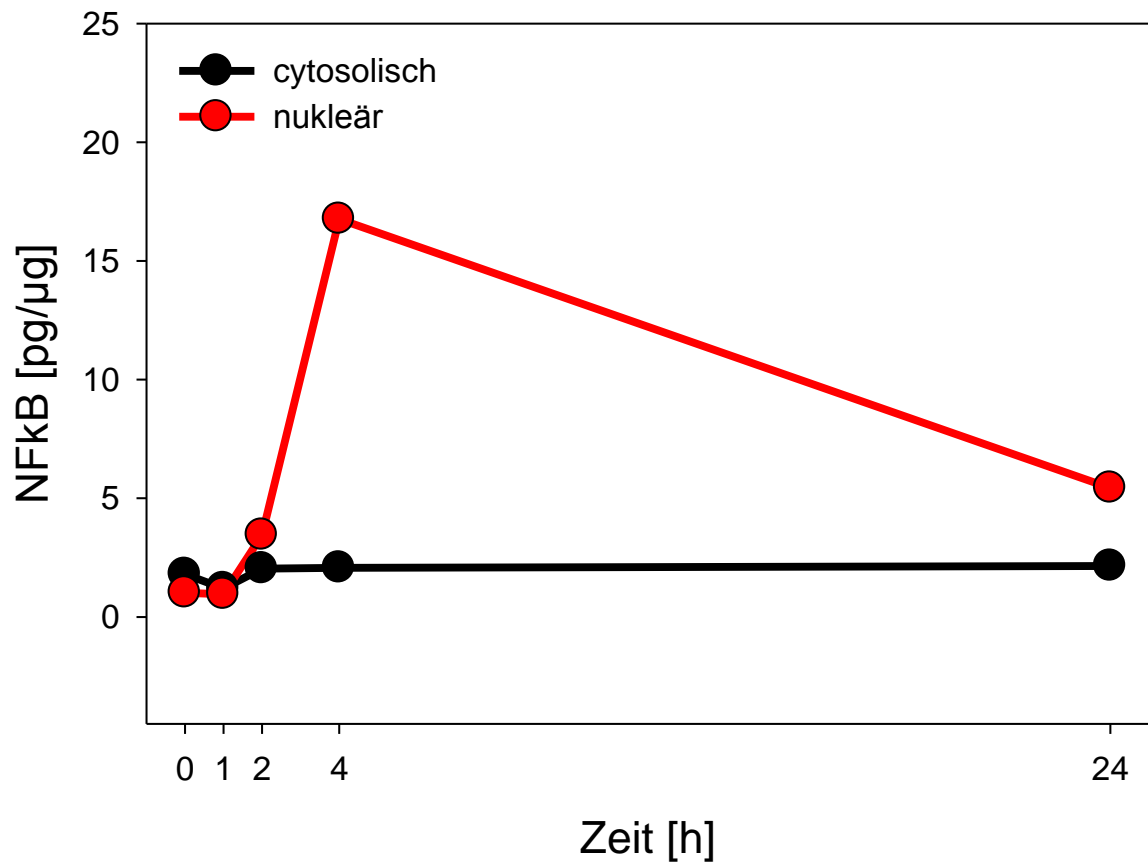


Abb.14: Mittelwerte (n=3) der NF-κB Konz. der ATI-Zellen im zeitlichen Dehnungsverlauf (40-30) bei 0h, 1h, 2h, 4h und 24h

4.4.2 A 549 – Zellen

Bei den A549 – Zellen wurde eine leichte Erhöhung der aktivierten NFκB - Konzentration nach 4h in den cytosolischen Extrakten festgestellt und ein Maximum in den nukleären Extrakten nach 1h. Nach 24 Stunden sank die NFκB – Konzentration wieder auf den Ausgangswert zurück.

Zeit	Aktiviertes NFκB im Cytosol (pg/mg Protein)	Aktiviertes NFκB im Zellkern (pg/mg Protein)
0h	6,25	8,415
1h	6,42	14,4
2h	6,305	12,375
4h	8,2	10,455
24h	6,21	8,06

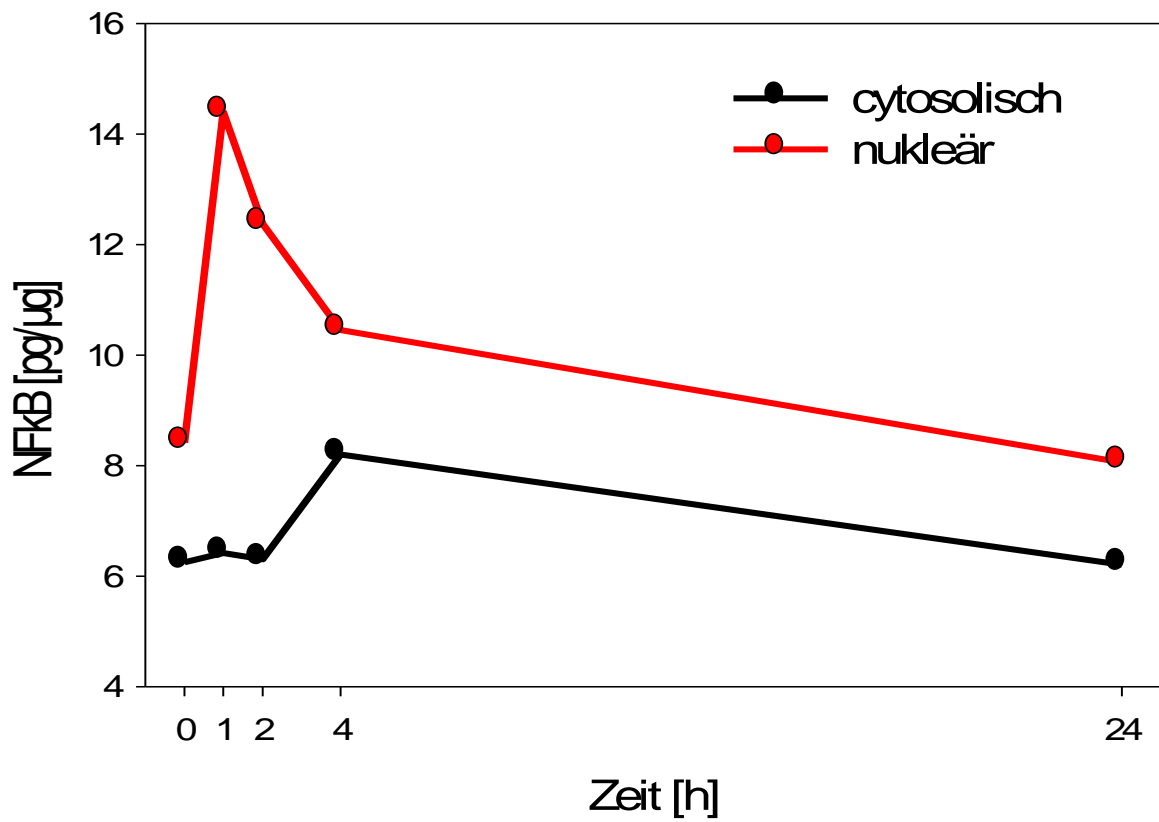


Abb.15: Mittelwerte (n=3) der NF-κB Konz. der A549 - Zellen im zeitlichen Dehnungsverlauf (40-30) bei 0h, 1h, 2h, 4h und 24h

4.4.3 Fibroblasten (Wi 38 – Zellen)

Auch bei den Fibroblasten ist sowohl in den cytosolischen wie auch in den nukleären Lysaten ein Anstieg der aktivierten NFκB – Konzentration sichtbar. Wobei dieser auf der einen Seite in leichter Form cytosolisch nach 2h erkennbar wurde und auf der anderen Seite nukleär ein eindeutiges Maximum ebenfalls nach 2h beobachtet werden konnte, jedoch nicht signifikant.

Zeit	Aktiviertes NFκB im Cy- tosol (pg/mg Protein)	Aktiviertes NFκB im Zellkern (pg/mg Protein)
0h	2,105	2,88
1h	4,23	6,525
2h	5,285	11,305
4h	3,42	3,485
24h	2,715	3,005

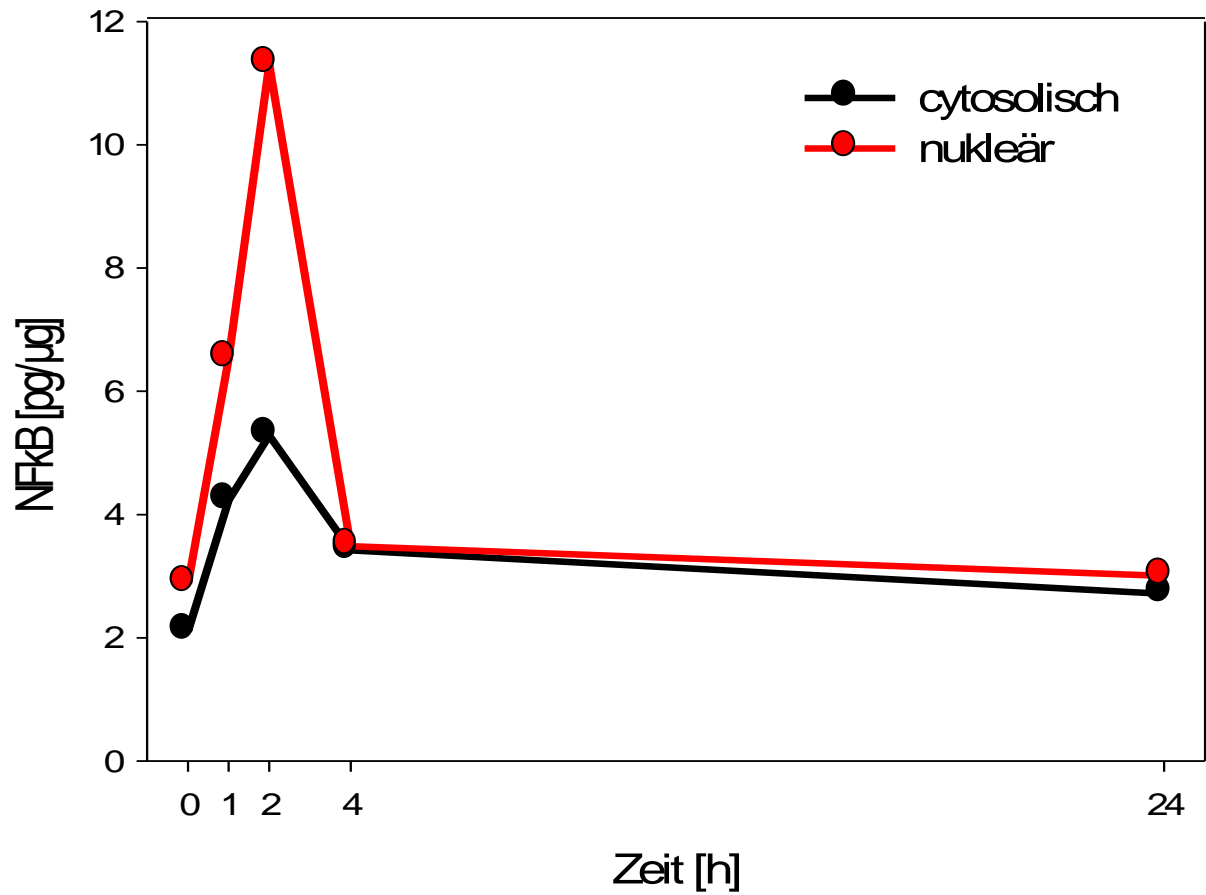


Abb.16: Mittelwerte (n=3) der NF-κB Konz. der Wi38 - Zellen im zeitlichen Dehnungsverlauf (40-30) bei 0h, 1h, 2h, 4h und 24h

4.5 Vergleiche zwischen den unterschiedlichen Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass alle drei Zellarten – AT-II-, A549- und Wi38 - Zellen differenziert auf die mechanische Belastung reagieren. Auch wird NF- κ B im zeitlichen Verlauf bei unphysiologischer Dehnung bei allen Zellarten nach unterschiedlicher Zeit verschieden stark aktiviert (s. 4.4).

Durch physiologische Dehnung wird NF- κ B bei den Typ II-Pneumozyten nicht vermehrt aktiviert, obwohl die Dehnung bereits zu einer Membranschädigung führt. Bei unphysiologisch starker Dehnung mit erhöhter Atemfrequenz kommt es bei den AT II – Zellen zu einem massiven Anstieg von aktiviertem NF- κ B im Zellkern. Dies korreliert mit dem Grad der Zellschädigung bei dem 40/30-Dehnungsmuster.

Dehnung mit erhöhter Frequenz und Amplitude führt bei den A549 - Zellen zur Zellschädigung, allerdings spiegelt sich dies nicht in der Aktivierung von NF- κ B beim 40/30-Dehnungsmuster wieder. Es kommt zu einer Senkung der NF- κ B – Konzentration nach 24h in den nukleären Extrakten bei unphysiologischer Dehnung.

Auch bei den Fibroblasten werden die Zellen bei unphysiologischer Dehnung nach 24h geschädigt, obwohl es bei den Wi-38-Zellen weder bei der 20/15- noch bei der 40/30-Dehnung zu einer differenzierten Aktivierung von NF- κ B in den nukleären Extrakten kam.

4.6 Statistische Auswertung

Die Erfassung der Daten erfolgte mit Microsoft EXEL. Die Diagramme wurden mittels dem Computerprogramm SigmaPlot (2001, Version 7.0; SPSS inc., Chicago, USA) erstellt. Für die Vergleiche zwischen den Versuchsgruppen wurde in Abhängigkeit des Vorliegens einer Normalverteilung entweder ein t-Test für abhängige Stichproben (gepaarter t-Test) oder der Wilcoxon-Test verwendet (ausgewertet mit SPSS 15.0 für Windows). Ein Niveau von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant festgelegt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

5 Diskussion

5.1 NF- κ B-Aktivierung in pulmonalen Strukturzellen bei mechanischer Belastung

In den Versuchen wurde deutlich, dass die gewählten Dehnintensitäten und -dauer zu einer Membran- bzw. Zellschädigung im Rahmen der mechanischen Belastung geführt haben. In den Versuchen waren sowohl bei den A549 –, den WI 38- wie auch bei den Typ-II Zellen signifikant höhere LDH-Werte im pathologischen Dehnmuster (40-30) zu messen.

Dieses Ergebnis konnte bei den Typ II Pneumozyten, den Fibroblasten und den humanen Epithelzellen (A549) erwartet werden, da die verstärkte mechanische Belastung zu Apoptose und Nekrose in den Zellen führen und die Zellproliferation inhibieren kann (Hammerschmidt et al. 2004; Sanchez-Esteban et al. 2002; Wu et al. 2009).

Nach 24 Stunden zeigte sich in den durchgeführten Versuchen, dass bei den Typ-II Zellen eine deutliche Zunahme der NF- κ B - Konzentration in den nukleären Extrakten bei Dehnung mit erhöhter Frequenz und Amplitude zu sehen ist. Dies korreliert mit dem Anstieg der LDH-Konzentration unter gleichen Bedingungen. Daraus schlussfolgernd stehen bei den AT II-Zellen die NF- κ B- Aktivierung und die Zellschädigung in unmittelbarem Zusammenhang. Die Frage ist nun, wie dieses Resultat gewertet werden kann.

Bekannt ist, dass mechanische Beatmung zu einer Zunahme von proinflammatorischen Zytokinen und Mediatoren führt wie z.B. TNF- α , Interleukine wie IL-1 β , IL-6 und IL-10 (Tremblay et al. 1997). Inflammatorische Zytokine, die während der künstlichen Lungenbeatmung synthetisiert werden, sind in der Lage zur Entwicklung eines akuten Lungenversagens wie ARDS sowie zu multiplen Organschädigungen wie dem MSOF beizutragen (Liu und Slutsky 1997).

Bei der Aktivierung dieser proinflammatorischen Zytokine spielt NF- κ B eine entscheidende Rolle, da einige dieser von NF- κ B induzierten Proteine und Faktoren den Transkriptionsfaktor selbst aktivieren können (Collins et al. 1995). Die Cytokine TNF α , IL-1 sowie IL-6 gehören beispielsweise dazu und sind zugleich auch die wichtigsten NF- κ B gesteuerten Akute-Phase-Regulatoren (Baldwin 1996). Ebenso nimmt

NF- κ B eine grundlegende Rolle in physiologischen Differenzierungsprozessen, der Zellzyklusprogression sowie der Apoptose ein (Baldwin 1996; Aggarwal 2000; Chen et al. 2001; Tak und Firestein 2001; Barkett und Gilmore 1999). Ein entscheidender Faktor bei der Entstehung von Entzündungsreaktionen ist die Rekrutierung von Monozyten, Granulozyten sowie T- Lymphozyten aus dem Kreislauf an den Ort der Inflammation (Nichols et al. 2001). Die dort aktivierten Leukozyten produzieren nun ihrerseits proinflammatorische Mediatoren, die das Entzündungsgeschehen initiieren und fortschreiten lassen. Die schon erwähnten proinflammatorischen Cytokine TNF α und IL-1 aktivieren NF- κ B in dieser Anfangsphase der Entzündung, was wiederum zur Produktion von weiteren entzündungsfördernden Cytokinen und zur Expression von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 sowie E-Selektin führt. Diese sind für das Rekrutieren und Aktivieren der Leukozyten verantwortlich. Die durch das aktivierte NF κ B induzierten proinflammatorischen Zielgene sind unter anderem IL-1, IL-2, IL-6, IL-17, TNF α , MCP-1, GM-CSF, COX-2, ROI sowie iNOS (Tak und Firestein 2001; Chen et al.1999; Makarov 2000).

Nach 24 Stunden kam es bei den A549-Zellen zu einer Verringerung der NF- κ B-Konzentration und bei den Fibroblasten war gar kein Unterschied zwischen den statischen Kontrollproben und den im pathologischen Dehnmuster gestreckten Zellen zu beobachten. Dies korreliert nicht mit dem Grad der Membranschädigung unter gleichen Bedingungen.

Jedoch wurde auch bei der Untersuchung der Abhängigkeit der NF- κ B-Expression vom zeitlichen Verlauf während der mechanischen Dehnung, in den nukleären Extrakten der AT-II-Zellen nach vier Stunden, in den Proben der A549-Zellen bereits nach einer Stunde und bei den Fibroblasten nach zwei Stunden ein Maximum der NF- κ B-Konzentration festgetstellt. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass es sehr wohl in allen drei Zellarten zu einem Anstieg der NF- κ B-Konzentration unter mechanischer Belastung kommt, allerdings zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Dass dieser Anstieg bei den AT II-Zellen mit einer inflammatorischen Reaktion einhergehen kann, konnte, wie oben beschrieben, schon mehrfach beobachtet werden. Auch finden sich in der Literatur Studien, die eine erhöhte Zytokinfreisetzung und sogar NF- κ B-Aktivierung (Rel A) auch in A549-Zellen nach mechanischer Dehnung nachgewiesen haben

(Ning und Wang 2007). Lediglich in humanen Lungenfibroblasten konnte noch keine direkte Verbindung zwischen NF- κ B und pulmonaler Entzündungsreaktion nachgewiesen werden.

5.2 Effekte von mechanischem Stress in Lungen-Zellen

Es ist mittlerweile bekannt, dass bei der Regulation, Funktion und Metabolismus der Lungenzellen mechanische Kräfte eine entscheidende Rolle spielen (Riley et al. 1990). Sind sie abnormal, können daraus aber auch unterschiedliche pathologische Prozesse resultieren, die das Lungengewebe schädigen. So bedürfen die durch mechanischen Stress hervorgerufenen Krankheiten der Lunge wie z.B. das Barotrauma, infolge der intensivmedizinischen künstlichen Beatmung, Pulmonary Hypertension, Pulmonary Hypoplasia, Asthma bronchiale oder COPD noch einer intensiveren Forschung, um erfolgreich präventiv und therapeutisch gegen sie vorgehen zu können. Denn die Regelkreise intrazellulärer Signaltransduktionswege, die durch mechanische Stimulation ausgelöst werden, sind noch nicht ausreichend aufgeklärt.

Ableitend daraus, kann keine klare Aussage getroffen werden wie genau die mechanische Reizung in ein intrazelluläres biochemisches Signal umgewandelt wird. Es gibt unterschiedliche Erklärungsversuche.

Um Schädigungen rechtzeitig entgegenzuwirken, müssen diese Vorgänge weiter untersucht werden, um entsprechende Behandlungsmethoden entwickeln zu können.

Es sind bereits diverse Versuche mit Zellen unterschiedlichen Gewebes durchgeführt worden, die verschiedensten Methoden mechanischer Dehnung exponiert waren, wie z.B. zelluläre und molekulare Antworten von Herzmuskelzellen auf mechanische Dehnung (Sandoshima und Izumo 1997), Genregulation durch mechanische Dehnung von Endothelzellen (Resnick et al. 1997), Mechanotransduktion von Gefäßmuskelzellen (Osol 1995), Knochenzellen (Turner et al. 1995) sowie Endothelialzellen (Davies 1995; Davies et al. 1997).

Auch Zellen der Lunge wurden bereits mehrfach in Verbindung mit mechanischer Dehnung untersucht. Wobei einerseits die Zytokinfreisetzung (Hammerschmidt et al. 2005) und andererseits Apoptose und Nekrose (Hammerschmidt et al. 2004) im Mittelpunkt der Studien standen. Diese Arbeit versucht, beide Zellreaktionen miteinander in Zusammenhang zu bringen. Das Verbindungsstück heißt NF- κ B.

NF- κ B spielt eine bedeutende Rolle als Regulator bei der Expression von Genen, die grundlegende Funktionen im Entzündungsgeschehen, bei der Apoptose, der Immunantwort und der Zellproliferation haben. So ist er unter anderem an der Transkription zahlreicher Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8 und TNF α als auch den mitogeninduzierten Enzymen Cox-2 und iNOS bis hin zu Granulozyten / Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) beteiligt (Baldwin 2001; Baeuerle und Baltimore 1996; Newton et al. 1997; Chen et al. 2001; Blackwell und Christman 1997; Tak und Firestein 2001; Barkett und Gilmore 1999).

Aus diesem Grund stehen Arbeiten, die sich mit Zytokinfreisetzungen und Apoptose bzw. Nekrose bei mechanischer Dehnung von Zellen beschäftigt haben in unmittelbarem Zusammenhang mit NF- κ B.

-Zytokinfreisetzungen bei mechanischer Dehnung

Bekannt ist, dass mechanische Beatmung zu einer Zunahme von proinflammatorischen Zytokinen und Mediatoren führt wie z.B. TNF- α , Interleukine wie IL-1 β , IL-6 und IL-10 (Tremblay et al. 1997; Hammerschmidt et al. 2005).

Die Freisetzung des Interleukins IL-8 beobachtete man bei der Belastung der auch in dieser Arbeit untersuchten human-alveolaren Epithelzelllinie A549 mit dem Flexercell Stretchgerät (Vlahakis et al. 1999). Als Entzündungsmediator spielt IL-8 damit eine wichtige Rolle bei einer inflammatorischen, pulmonalen Reaktion und ist in der Lage, NF- κ B zu aktivieren (Manna und Ramesh 2005). Im zeitlichen Verlauf der von uns untersuchten NF- κ B-Aktivierung konnte auch festgestellt werden, dass es nach einer Stunde unphysiologisch erhöhter mechanischer Dehnung zu einem Anstieg der NF- κ B-Konzentration in den nukleären Extrakten kam.

Ebenso wie IL-8 NF- κ B beeinflusst bzw. durch NF- κ B beeinflusst werden kann, gilt dies auch für andere pro- wie auch anti-inflammatorische Cytokine.

Einige dieser von NF- κ B induzierten Proteine und Faktoren, können den Transkriptionsfaktor selbst aktivieren (Collins et al. 1995). Dazu gehören beispielsweise die Cytokine TNF α , IL-1 sowie IL-6. Diese sind zugleich auch die wichtigsten NF- κ B gesteuerten Akute-Phase-Regulatoren, welches die Schlussfolgerung zulässt: Wenn die NF- κ B-Konzentration im Kern bei mechanischer Dehnung ansteigt, muss es gleich wohl auch zu einer Erhöhung der Cytokinkonzentrationen von IL-1, IL-6, IL-8 und TNF α im Cytoplasma kommen (Baldwin 1996).

Inflammatorische Zytokine, die während der maschinellen Beatmung synthetisiert werden, sind in der Lage zur Entwicklung eines akuten Lungenversagens wie ARDS sowie zu multiplen Organschädigungen wie bei MSOF beizutragen (Liu und Slutsky 1997).

Auch von Bethmann et.al. zeigte, dass bei isolierten Mäuselungen höhere Werte von TNF- α , und IL-6 im Perfusat gemessen wurden, wenn die mechanische Dehnung über die physiologische Atemfrequenz und -amplitude hinaus erhöht wurde (von Bethmann et al. 1998).

Es konnte ebenfalls beobachtet werden, dass primär in Kultur gelegte alveolare Epithelzellen, prozentual weniger Schaden nahmen, wenn sie am fünften und nicht am ersten Tag gedehnt wurden (Tschumberlin und Margulies 1998).

Auch die Prostaglandinsynthese wird durch mechanische Dehnung beeinflusst. So ist bekannt, dass die Synthese von biologisch aktiven Eicosanoiden durch die Epithelzellen der Luftwege zur Regulierung des Tonus der glatten Muskeln in den Luftwegen beiträgt und proinflammatorisch wirkt. In einer Studie konnte die Abnahme der Prostaglandinsynthese unter anderem von PGE₂, PGI₂, Thromboxane A₂ von Katzen sowie humanen Lungenepithelzellen unter zyklischer Dehnung mit dem Flexercell Stretch Gerät beobachtet werden (Savla et al. 1997). Im Gegensatz dazu wurde in anderen Studien eine rapide Zunahme von Prostacyclinen unter Scheerstress bei fetalen Rattenlungenzellen gezeigt (Reeves et al. 1983; Skinner et al. 1992).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass verschiedene mechanische Belastungen auch zu unterschiedlichen inflammatorischen Reaktionen führen können.

Insgesamt wurde festgestellt, dass Alveolarschäden mit dem Ausmaß und der Dauer der Dehnung zu- und mit der zellulären Dichte abnehmen (Tschumperlin und Margulies 1998).

Die maschinelle Beatmung ist wie bereits erwähnt eine wichtige Therapiemaßnahme, kann aber selbst auch ein akutes Lungenversagen begünstigen. Eine Dehnung der Lungenzellen kann neben reversiblen Veränderungen auch zu irreversiblen Schädigungsmechanismen und zur Umstrukturierung von Alveolen beitragen. Eine massive Granulozytenverteilung von der Lunge (Alveolen) ausgehend über das Herz in den großen Kreislauf als Folge eines durch alveoläre Überdehnung initiierten Entzündungsgeschehens, kann schließlich eine entscheidende Rolle beim MSOF (Multiple System Organ Failure) und Schock spielen (Slutsky und Tremblay 1998; Donnelly und Haslett 1992; Imanaka et al. 2001).

Wie genau die mechanische Belastung aber die Zellen beeinflusst und dieses Signal intrazellulär verarbeitet wird, ist bisher nur unzureichend beschrieben worden. Das Modell der Stretch-aktivierten Ionenkanäle und das Extrazellulär-Integrin-Cytoskelett-Modell sind die am meisten beachteten Erklärungsversuche (Ingber 1991; Ingber 1993; Maniotis et al. 1997).

Die Aktivität der Ionenkanäle von Lungenzellen wird durch mechanische Dehnung beeinflusst. In diesem Zusammenhang ist Ca^{2+} das am meisten beschriebene Ion, welches durch Dehnung der Zellen ein intrazelluläres Signal vermittelt. Bialecki et al. fand bei der Untersuchung des Calciumein- und -ausstroms in Rattenzellen eine Zunahme desselben bei 20 %-iger Dehnung von glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien heraus (Bialecki et al. 1992).

Intergrine verbinden im Extrazellulärraum die Zellen miteinander und haben selbst wiederum Kontakt mit dem Cytoskelett. Dadurch wird eine Signalübertragung vom Extrazellulärraum über die Zelloberfläche in das Zellinnere ermöglicht. Bei den Integ-

ringen konnte nun beobachtet werden, dass eine Druckausübung mittels einer Micropipette zu einer Umorientierung der Cytoskelettfilamente führt. Damit führt mechanischer Stress zu einer Änderung der Cytoskeletalstarre, was wiederum eine Beeinflussung spezifischer Regulatorproteine in den Zellen zur Folge haben kann (Ingber 1991; Ingber 1993; Maniotis et al. 1997; Wang et al. 1993).

- Zellschädigungen bei mechanischer Dehnung (Apoptose/Nekrose/Inflammation)

Verstärkte mechanische Dehnung (pathologisch erhöhte Frequenz und Amplitude) können zur Auslösung von Apoptose und Nekrose bei alveolaren Typ-II-Zellen führen. Was in dieser Arbeit durch eine erhöhte Zell-/ Membranschädigung in Form einer erhöhten LDH-Konzentration bestätigt werden konnte. Durch Gabe von Captopril und L-Arginin kann die Apoptose bei Dehnung mit hoher Amplitude allerdings verhindert werden (Hammerschmidt et al. 2004).

In einer aktuellen Studie von Wu et al. wurde festgestellt, dass zyklische mechanische Dehnung von A549-Zellen zu einer erhöhten Freisetzung von Pentraxin 3 Protein führt, woraus wiederum eine vermehrte Apoptose und Nekrose in den Zellen induziert wird (Wu et al. 2009)

Auch in fetalen Lungenfibroblasten von Ratten konnte nachgewiesen werden, dass mechanische Dehnung zu einer Inhibition der Zellprogression und zur Aktivierung von Apoptose führen kann (Sanchez-Esteban et al. 2002).

Patienten, die bereits ein Multi-Organ-Versagen (MOF) haben, müssen meist über mehrere Tage beatmet werden. Die meisten Studien untersuchten vorrangig den Beginn des MOF. Uhlig et al. beobachtete hingegen den Verlauf in Abhängigkeit verschiedener Ventilationsstrategien. Nach intraperitonealer Zymosaninjektion wurden Mäuselungen ex vivo normal (protective)- und überventiliert (Overventilation). Nach 7 Tagen zeigte sich eine erhöhte NF- κ B-Aktivierung, Aktkinase Phosphorylierung und Zytokinfreisetzung, welche ferner durch Überventilation verschlimmert wurde. Nach 14 Tagen konnte eine pulmonale Hypertension, eine reduzierte Lungenfunktion und eine pulmonale Inflammation festgestellt werden (Uhlig et al. 2006).

5.3 Zukünftige Studien

In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass mechanischer Stress allein zu einer deutlichen Erhöhung von LDH und einer unterschiedlichen Aktivierung von NF- κ B bei alveolären Pneumozyten Typ-II, humanen Lungenfibroblasten (Wi 38) und humanen Lungenepithelzellen (A549) geführt haben. Im Zusammenhang mit anderen Studien lässt das die Schlussfolgerung zu, dass Patienten, die künstlich beatmet werden, leichter eine Entzündung der Atemwege entwickeln können, was wiederum ein akutes Lungenversagen oder sogar ein multiples Organversagen zur Folge haben kann. In vielen Studien werden bereits Interventionsstrategien untersucht, um die Gefahr eines Ventilator-induzierten-Lungenversagens (VILI) zu reduzieren. So wurde in einer Studie festgestellt, dass Rapamycin die Apoptose in pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen nach mechanischer Dehnung reduzieren kann (Raaz et al. 2009). Aber auch verschiedene bzw. wechselnde Ventilationsstrategien können einen protektiven Effekt durch Anregung der Surfactant-Sekretion haben (Stephen et al. 2009). In zukünftigen Studien müssen weitere Strategien entwickelt werden, ob nun in Form einer Pharmakaintervention oder veränderter Ventilationsstrategien, um Lungenschäden durch Ventilator-induziertes Lungenversagen oder sogar ARDS zu vermeiden bzw. zu verringern.

Weiterer Forschungsbedarf ist insbesondere auf dem Gebiet der Signaltransduktion von mechanischem Reiz in eine biochemische Reaktion nötig. Um intervenieren zu können, müssen die Signaltransduktionswege besser aufgeklärt werden. Es konnte zum Beispiel schon festgestellt werden, dass IL-10 einen protektiven Effekt in Form der Inhibition von IL-8 während der mechanischen Belastung haben kann (Hyeon-Soo et al. 2008)

Auch die Interaktion von mehreren zusammentreffenden Faktoren wie Dehnung, Entzündung, Fibrose oder auch ein malignes Geschehen sollten weiter untersucht werden. Wie reagieren pulmonale Strukturzellen bei Stretch in Anwesenheit von anderen schädigenden Einflüssen wie z.B. bakterieller oder viraler Inkontamination, Hyper- oder Hypoxie.

Wichtig wäre auch eine Kombination der in-vitro mit den in-vivo-Versuchen. Zellkulturen haben zwar den Vorteil, dass man eine Zellgruppe unter gut kontrollierten Bedingungen untersuchen kann, das Tiermodell oder aber auch das Modell der isolierten Tierlunge ermöglichen die Erforschung komplexer (patho)physiologischer Zusammenhänge. Auch die Kommunikation zwischen verschiedenen Zell-Typen oder die Komplexität von Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen kann nicht vollkommen in Zell-Kulturen simuliert werden. Ein weiterer wichtiger Schritt wäre auch der Vergleich der aus Tierzellen gewonnenen Werte mit denen aus humanen Lungengewebe.

6 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der mechanischen Dehnung von pulmonalen Strukturzellen

eingereicht von:

Franziska Maser, geb. am 02.12.1982

angefertigt in:

Medizinische Klinik und Poliklinik I, Abteilung für Pneumologie, Universitätsklinikum Leipzig

betreut von:

Prof. Dr. med. H. Wirtz

Dr. rer. nat. H. Kuhn

Dr. med. habil. S. Hammerschmidt

September 2009

Obwohl die künstliche bzw. mechanische Beatmung bei der Therapie von ALI / ARDS eine wichtige und bedeutende Rolle spielt, kann sie selbst eine akute Lungenschädigung auslösen oder bestehende pulmonale Beeinträchtigungen verstärken. Zentraler Schädigungsmechanismus ist die alveoläre Überdehnung durch hohe Tidalvolumina. Selbst bei der Anwendung kleiner, protektiver Tidalvolumina in Lungen mit einem nur geringen Anteil belüfteter Alveolen kann es in diesen zu alveolärer Überdehnung kommen. Diese Überdehnung führt einerseits zu mechanisch induzierter Apoptose sowie Nekrose und andererseits zu einer mechanisch induzierten Veränderung der Mediatorenfreisetzung hin zu einem pro-inflammatorischen Muster. Da der Transkriptionsfaktor NF- κ B zahlreiche Mediatoren aktiviert bzw. von ihnen beeinflusst werden kann, nimmt er in diesem Geschehen eine ganz besondere Schlüsselposition ein.

In der vorliegenden Arbeit wird der Hypothese nachgegangen, ob die NF- κ B-Aktivierung bei der mechanischen Dehnung und dem daraus resultierenden inflammatorischen Verhalten von pulmonalen Strukturzellen verändert wird und in wie weit ein Zusammenhang zwischen Dehnung, Zellschädigung und NF- κ B besteht.

Dafür wurden sowohl frisch isolierte alveoläre Ratten-Typ-II Zellen, Zellen der human-alveolaren Epithelzelllinie A549 sowie Lungen- Fibroblasten der Zell-Linie Wi 38 untersucht. Alle drei Zellarten wurden auf einem speziellen elastischen Silikonboden von 6er-Well-Platten inkubiert, wo sie mit Hilfe des Flexercell-Stretch-Gerätes (FX 3000) als Zellmonolayer equibiaxial für 24 Stunden gedehnt wurden.

Auch die zeitliche Abhängigkeit der NF- κ B-Expression von der mechanischen Dehnung wurde untersucht.

Dabei konnte festgestellt werden, dass ein Zusammenhang zwischen NF- κ B-Aktivierung, Zellschädigung und mechanischer Dehnung existiert. Wobei bei unterschiedlichen Zellarten auch variierende Ergebnisse beobachtet werden konnten.

Im Zusammenhang mit anderen aus unserer Forschungsgruppe und in der Literatur stammenden Erkenntnissen konnte so eine Verknüpfung zwischen NF- κ B-Aktivierung, Zytokinfreisetzung und inflammatorischer pulmonaler Reaktion nachgewiesen werden.

7 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, B. B. (2000): Apoptosis and nuclear factor- κ B: a tale of association and dissociation. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1033-1039.
- Agou, F., Ye, F., Goffinon, S., Courtois, G., Yamaoka, S., Israel, A. und Veron, M. (2002): NEMO trimerizes through its coiled-coil C-terminal domain. *J Biol Chem.* 277, 17464-17475.
- Akira, S. und Kishimoto, T. (1997): NF-IL6 and NF-kappa B in cytokine gene regulation. *Adv. Immunol.* 65,1-46.
- Andersen, N.H., Hartzell, C.J. und De, B. (1985): Chemistry and structure of cyclooxygenase-derived eicosanoids: a historical perspective. *Advanc. Prostagl. Thrombox. Leukotr. Res.* 14.
- Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, AWMF (1996): Leitlinie Intensivmedizin. Akutes Lungenversagen. AWMF-Leitlinien-Register Nr.: 040/005
- Argiras, E.P., Blakeley, C.R., Dunnill, M.S., Otremski, S. und Sykes, M.K. (1987): High PEEP decreases hyaline membrane formation in surfactant deficient lungs. *Br.J.Anaesth.* 59, 1278-1285.
- Ashbaugh, D.G., Bigelow, D.B. und Petty, T.L. (1967): Acute respiratory distress in adults. *Lancet.* II, 319-323.
- Atabai, K. und Matthay, M.A. (2002): The pulmonary physician in critical care. 5: Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: definitions and epidemiology. *Thorax.* 57, 452.
- Baeuerle, P.A. und Baltimore, D. (1988a): Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell.* 53, 211-217.
- Baeuerle, P.A. und Baltimore, D. (1988b): I kappa B: a specific inhibitor of the NF kappa B transcription factor. *Science.* 242, 540-546.
- Baeuerle, P.A. und Baltimore, D. (1996): NF- κ B: Ten years after. *Cell.* 87, 13-20.
- Baeuerle, P.A. und Henkel, T. (1994): Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 12, 141-179.
- Baldwin, A. S. (1996): The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 649-681.

- Baldwin, A. S. Jr., Series introduction (2001): the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest.* 107,3-6.
- Barkett, M. und Gilmore, T.D. (1999): Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 18, 6910-6924.
- Barnes, P. J. und Karin, M. (1997): Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New Engl. J. Med.* 336, 1066-1071.
- Bartels, H., Oestern, H.J. und Voss-Wermbter, G. (1980): Communicating – occluding junction complexes in the alveolar epithelium. *Am. Rev. Respir. Dis.* 121, 1017-1024.
- Beg, A. A. und Baldwin, A.S. Jr. (1993): The I κ B proteins: multifunctional regulators of the Rel / NF- κ B transcription factors. *Genes Dev.* 7, 2064-2070.
- Bernard, G.R., Artigas, A., Brigham, K.L., Carlet, J., Falde, K., Hudson, L., Lamy, M., Legall, J.R., Morris, A. und Spragg, R. (1994): The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 149, 818-824.
- Bialecki, R.A., Kulik, T.J. und Colucci, W.S. (1992): Stretching increases calcium influx and efflux in cultured pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 263 (Lung Cell Mol. Physiol. 7), 602-606.
- Bishop, J. E., Mitchell, J. J., Absher, P. M., Baldor, L., Geller, H. A., Woodcock-Mitchell, J., Hamblin, M. J., Vacek, P. und Low, R. B. (1993): Cyclic mechanical deformation stimulates human lung fibroblast proliferation and autocrine growth factor activity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 9, 126-133.
- Blackwell, T.S. und Christman, J.W. (1997): The role of nuclear factor- κ B in cytokine gene regulation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17, 3.
- Brand, K., Eisele, T., Kreusel, U., Page, M., Page, S., Haas, M., Gerling, A., Kaltschmidt, C., Neumann, F.J., Mackman, N., Baeuerle, P.A., Walli, A.K., Neumeier D. (1997): Dysregulation of monocytic nuclear factor- κ B by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17, 1901-1909.
- Brigham, K.L. und Meyrick, B. (1986): Endotoxin and lung injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133, 913-927.
- Brower R.G. und Fessler, H.E. (2000): Mechanical ventilation in acute lung injury

- and acute respiratory distress syndrome. Clin.Chest Med. 21, 491-510.
- Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G. und Siebenlist, U. (1995): Control of I κ B α proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. Science. 267, 1485-1491.
- Chen, C.-C., Sun, Y.-T., Chen, J.-J. und Chang, Y.-J. (2001): Tumor necrosis factor- α - induced cyclooxygenase-2 expression via sequential activation of ceramidedependent mitogen-activated protein kinases, and I κ B kinases 1/2 in human alveolar epithelial cells. Mol. Pharmacol. 59(3), 493.
- Chen, F., Castranova, V. und Shi, X. (2001): New insights into the role of nuclear factor- κ B in cell growth regulation. Am. J. Pathol. 159, 387-397.
- Chen, F., Castranova, V., Shi, X. und Demers, L.M. (1999): New insights into the role of nuclear factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. Clin. Chem. 45, 7-17.
- Chiumello, D., Pristine, G. und Slutsky, A. S. (1999): Mechanical ventilation affects local and systemic cytokines in an animal model of acute respiratory distress syndrome. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 160, 109-116.
- Christman, J.W., Sadikot, R.T. und Blackwell, T.S. (2000): The role of nuclear factor- κ B in pulmonary diseases. Chest. 117, 1482.
- Collins, T., Read, M.A., Neish, A.S., Whitley, M.Z., Thanos, D. und Maniatis, T. (1995): Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers. Faseb J. 9,899-909.
- Davies, P. F. (1995): Flow mediated endothelial mechanotransduction. Physiol. Rev. 75, 519-560.
- Davies, P.F., Barbee, K.A., Volin, M.V., Robotewskyj, A., Chen, J., Joseph, L., Griem, M. L., Wernick, M. N., Jacobs, E., Polacek, D.C., Depaola, N. und Barakat, A. I. (1997): Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. Annu. Rev. Physiol. 59, 527-549.
- Davis, J.N., Kucuk, O., Djuric, Z. und Sarkar, F.H. (2001): Soy isoflavone supplementation in healthy men prevents NF- κ B activation by TNF- α in blood lymphocytes. Free Rad. Bio. Med. Vol. 30, No. 11, 1293 – 1302.
- Davis, N., Ghosh, S., Simmons, D. L., Tempst, P., Liou, H. C., Baltimore, D. und

- Bose, H. R. (1991): Rel-associated pp40: an inhibitor of the rel family of transcription factors. *Science*. 253, 1268-1271.
- Dechend, R. (2004): Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und entzündlicher Reaktionen in der Pathogenese arteriosklerotischer und hypertensiver Gefäßschäden. Medizinische Habilitation. Berlin.
- Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y. und Karin, M. (1999): Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science*. 284, 309-313.
- DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rotwarf, D.M., Zandi, E. und Karin, M. (1997): A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 388: 548-554, 1997.
- Donnelly, S.C. und Haslett, C. (1992): Cellular mechanisms of acute lung injury: implication for future treatment of the adult respiratory distress syndrome. *Thorax*. 47, 260-263.
- dos Santos, C.C. und Slutsky, A.S. (2000): Mechanotransduction, ventilator-induced lung injury and multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med*. 26, 638-642.
- Dreyfuss, D, Basset, G., Soler, P. und Saumon, G. (1988): High inflation pressure pulmonary edema: respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am.Rev.Respir.Dis*. 137, 1159-1164.
- Eisenhardt, N.A. (2005): Selektive Hemmung der Aktivität des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor-kappa B im Modell der isolierten Rattenlunge nach Stimulation mit bakteriellem Endotoxin. Medizinische Doktorarbeit. Gießen.
- Ermert, L., Ermert, M., Althoff, A., Merkle, M., Grimminger, F. und Seeger, W. (1998): Vasoregulatory prostanoid generation proceeds via cyclooxygenase-2 in noninflamed rat lungs. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 286, 1309-1314.
- Evans, M. J., Cabral, L. J., Stephens, R. J. und Freemann, G. (1975): Transformation of alveolar type II cells to type I cells following exposure to nitrogen dioxide. *Exp. Mol. Pathol*. 22, 145-150.
- Fan, J., Ye, R.D. und Malik, A.B. (2001): Transcriptional mechanisms of acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol*. 281, 1037-1050.
- Fehrenbach, H., Kasper, M., Tscherning, T., Pan, T., Schuh, D., Shannon, J. M.,

- Müller, M. und Masson, R. J. (1999): Keratinocyte growth factor- induced hyperplasia of rat alveolar type II cells in vivo is resolved by differentiation into type I cells and by apoptosis. *Eur. Respir. J.* 14, 534-544.
- Fischer, C., Page, S., Weber, M., Eisele, T., Neumeier, D. und Brand, K. (1999): Different effects of LPS and TNF on monocytic IKK signalsome activation and I κ B proteolysis. *J Biol Chem.* 274, 24625-24632.
- Fishman, A.P. und Pietra, G.G. (1979): Hemodynamic pulmonary edema: In A.P.Fishman and E.M.Renkin, editors. *Pulmonary Edema. Clinical Physiology Series.* American Physiological Society, Bethesda, MD. 76-96.
- Ghosh S. und Karin M. (2002): Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell.* 109, 81-96.
- Ghosh, S., May, M. J. und Kopp, E. B. (1998): NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 225-260.
- Gosh, S. und Baltimore, D. (1990): Activation in vitro of NF- κ B by phosphorylation of its inhibitor I κ B. *Nature.* 344, 678-682.
- Grilli, M., Jason, J.S. und Lenardo, M.J. (1993): NF- κ B and Rel: Participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol.* 143, 1-62.
- Hammerschmidt, S., Kuhn, H., Grasenack, T., Gessner, C., Wirtz, H. (2004): Apoptosis and Necrosis induced by Cyclic mechanical stretching in Alveolar Type -II-Cells – Influence of Captopril and L-Arginine. *AM J Respir Cell Mol Biol.* 30(3), 396-402.
- Hammerschmidt, S., Kuhn, H., Sack, U., Schlenska, A., Gessner, C., Gillissen, A. (2005): Mechanical Stretch Alters Alveolar Type II Cell Mediator Release toward a Proinflammatory Pattern. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33, 203-210.
- Harding, R. (1991): Fetal breathing Movements. In: *The Lung: Scientific Foundations*, edited by R. G. Crystal und J. B. West. New York, Raven, 1655-1664.
- Haskill, S., Beg, A. A., Tompkins, S. M., Morris, J. S., Yurochko, A. D., Sampson - Johannes, A., Mondal, K., Ralph, P. und Baldwin, A. S. (1991): Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes

- that encodes I κ B-like activity. *Cell*. 65, 1281-1289.
- Herold, G. und Mitarbeiter (2005): *Innere Medizin*. Köln, 285-286.
- Hirsch-Hoffmann, A.-M., Hölzel, F. und Maass, H. (1964): Glykolytische Enzymaktivitäten in Zellen und Zellkernen des Ehrlich-Ascitescarcinoms. Springer Berlin, Heidelberg. Volume 51, Number 17, S. 414-415.
- Hofmann, E. (2001): *Medizinische Biochemie systematisch*. 3. Aufl. Bremen: Uni-Med Verlag, 499-500.
- Hubmayr, R. D., Shore, S. A., Fredberg, J. J., Planus, E., Panettieri, R. A. Jr., Moller, W., Heyder, J. und Wang, N. (1996): Pharmacological activation changes stiffness of cultured human airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 271 (Cell Physiol. 40), 1660-1668.
- Hudson, L.D. und Steinberg, K.P. (1999): Epidemiology of acute lung injury and ARDS. *Chest*. 116, 74-82.
- Hudson, L.D., Milberg, J.A., Anardi, D. und Maunder, R.J. (1995): Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med*. 151, 293-301.
- Hyeon-Soo, L., Yulian, W., Benjamin, Maciejewski, S., Esho, K., Fulton, C., Sharma, S. und Sanchez-Esteban, J. (2008): Interleukin-10 protects cultured fetal rat type II epithelial cells from injury induced by mechanical stretch. *Am J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 294, 225-232.
- Imanaka, H., Shimaoka, M., Matsuura, N., Nishimura, M., Ohta, N. und Kiyono, H. (2001): Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophil infiltration, macrophage activation, and TGF-beta 1 mRNA upregulation in rat lungs. *Anesth. Analg.* 92, 428-436.
- Ingber, D. E. (1991): Integrins as mechanochemical transducers. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 841-848.
- Ingber, D. E. (1993): The riddle of morphogenesis: a question of solution chemistry or molecular cell engineering. *Cell*. 75, 1249-1252.
- Israel A. (2000): The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol.* 10, 129-133.
- Israel A. (2003): A regulator branches out. *Nature*. 423, 596-597.
- Karin, M. (1999): How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene*. 18, 6867-6874.

- Karin, M. und Ben-Neriah, Y. (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Ann. Rev. Immunol.* 18, 621-663.
- Kitterman, J.A. (1996): The effects of mechanical forces on fetal lung growth. *Clin Perinatol.* 23(4), 727-40.
- Laskin, D.L., Soltys, R.A., Berg, R.A. und Riley, D. (1994): Activation of alveolar macrophages by native and synthetic collagen-like polypeptides. *Am.J.Respir.Cell. Mol.Biol.* 10, 58-64.
- Lawrence, T., Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R. und Willoughby, D.A. (2001): Possible new role for NF- κ B in the resolution of inflammation. *Nature.* 7(12), 1291.
- Liou, HC. und Baltimore, D. (1993): Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I-kappa B inhibitor system. *Curr Opin Cell Biol.* 5, 477-487.
- Liu, M, Xu, J., Souza, P., Tanswell, B. und Post, M. (1995): The effect of mechanical strain on fetal rat lung cell proliferation: comparison of two- and three- dimensional culture systems. *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 31, 858-866.
- Liu, M. und Slutsky, A. S. (1997): Anti- inflammatory therapies: application of molecular biology techniques in intensive care medicine. *Intensive Care Med.* 23, 718-731.
- Liu, M., Montazeri, S., Jedlovsky, T., Van Wert, R., Zhang, J., Li, R. K. und Yan, J. (1999): Bio-Stretch, a computerized cell- strain apparatus for three-dimensional organotypic cultures. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 35, 87-93.
- Liu, M., Skinner, S.J.M., Xu, J., Han, R.N.N., Tanswell, A.K. und Post, M. (1992): Stimulation of fetal rat lung cell proliferation in vitro by mechanical stretch. *Am. J. Physiol.* 263, 376-383.
- Liu, M., Xu, J., Souza, P., Tanswell, B. und Post, M. (1995): The effect of mechanical strain on fetal rat lung cell proliferation: comparison of two- and three- dimensional culture systems. *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 31:858-866.
- Liu, M., Liu, J., Buch, S., Tanswell, A.K. und Post, M. (1995): Antisense oligonucleotides for PDGF-B and its receptor inhibit mechanical strain induced fetal lung cell growth. *Am. J. Physiol.* 269 (Lung Cell Mol. Physiol. 13), 178-184.

- Makarov, S. S. (2000): NF- κ B as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. *Mol. Med. Today.* 9, 441-448.
- Maniotis, A. J., Chen, S. und Ingber, D. E. (1997): Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 849-854.
- Manna, S. und Ramesh, G. (2005): Interleukin-8 induces nuclear transcription factor-kappaB through a TRAF6-dependent pathway. *J Biol Chem.* 25;280(8), 7010-21.
- Martin, M.A. und Silverman, H.J. (1992): Gram-negative sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Clin. Infect. Dis.* 14, 1213-1228.
- Mason, R. J. und Shannon, J. M. (1997): Alveolar type II cells. *The Lung: Scientific Foundations* 2nd edition (Crystal, R.G., West, J.B., et al., eds), Raven Press, Ltd., New York, pp. 543-555.
- May, M. J. und Ghosh, S. (1998): Signal transduction through NF- κ B. *Immunol. Today.* 19, 80-88.
- May, M.J und Ghosh, S. (1997): Rel/NF-kappaB and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol.* 8, 63-73.
- Mead, J., Takishima, T. und Leith, L. (1970): Stress distribution in lungs: a model pulmonary elasticity. *J.Appl.Physiol.*, 28, 596-608.
- Mercurio, F. und Manning, A. M. (1999): NF- κ B as a primary regulator of the stress response. *Oncogene.* 18, 6163-6171.
- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Li, J., Young, D.B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A. und Rao, A. (1997): IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science.* 278, 860-866.
- Morgenroth, K. (1986): *Das Surfactantsystem der Lunge. Morphologische Grundlagen und Klinische Bedeutung.* Berlin, New York, Walter de Gruyter & Co, ISBN:3110110156
- Muscedere, J.G., Mullen, J.B., Gan, K. und Slutsky, A.S. (1994): Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 149, 1327-1334.
- Nathan, C.F. (1987): Neutrophil activation on biological surfaces. *J.Clin.Invest.*, 80, 1550-1560.

- Naumann, M. und Scheidereit, C. (1994): Activation of NF-kappaB in vivo is regulated by multiple phosphorylations. *Embo J.* 13: 4597-4607.
- Newton, R., Kuitert, L.M.E., Bergmann, M., Adcock, I.M. und Barnes, P.J. (1997): Evidence for involvement of NF- κ B in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1 β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 28.
- Nichols, T.C., Fischer, T.H., Deliargyris, E.N. und Baldwin, A.S., Jr. (2001): Role of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) in inflammation, periodontitis, and atherogenesis. *Ann Periodontol.* 6,20-9.
- Ning, Q, Wang, X. (2007): Role of Rel A and IkappaB of nuclear factor kappaB in the release of interleukin-8 by cyclic mechanical strain in human alveolar type II epithelial cells A549. *Respirology.* 12(6),792-8.
- O Neil, S., Lesperance, E. und Klaas, D.J. (1984): Lavage enhances bacterial phagocytosis and intracellular killing by alveolar macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130, 225-230.
- Osol, G. (1995): Mechanotransduction by vascular smooth muscle cells. *J. Vasc. Res.* 32, 275-292.
- Page, S., Fischer, C., Baumgartner, B., Haas, M., Kreusel, U., Loidl, G., Hayn, M., Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Neumeier, D. und Brand, K. (1999): 4-Hydroxynonenal prevents NF- κ B activation and TNF expression by inhibiting κ B phosphorylation and subsequent proteolysis. *J Biol Chem* 274, 11611-11618.
- Pahl, H. L. (1999): Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene.* 18, 6853-6866.
- Peters, R. T., Liao, S. M. und Maniatis, T. (2000): IKK ϵ is part of a novel PMA – inducible I κ B kinase complex. *Mol. Cell.* 5, 513-522.
- Phelps, C.B., Sengchanthalangsy, L.-L., Huxford, T. und Ghosh, G. (2000b): Mechanism of I κ B α binding to NF- κ B dimers. *J Biol Chem.*, 275, 29840-29846.
- Phelps, C.B., Sengchanthalangsy, L.-L., Malek, S. und Gosh, G. (2000a): Mechanism of κ B binding by Rel/NF- κ B dimers. *J. Biol. Chem.* 275 (32), 24392.
- Raaz, U., Kuhn H. Wirtz, H., Hammerschmidt S. (2009): Rapamycin reduces high-amplitude, mechanical stretch-induced apoptosis in pulmonary microvascular

- endothelial cells. *Microvasc Res.* 77(3), 297-303.
- Ranieri, V. M., Suter, P. M., Tortorella, C., De Tullio, R., Dayer, J.M., Brienza, A., Bruno, F. und Slutsky, A.S. (1999): Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA.* 282, 54-61.
- Rayet, B. und Gelinas, C. (1999): Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene.* 18, 6938-6947.
- Reeves, J. T., van Grondelle, A., Voelkel, N. F., Walker, B., Lindenfeld, J., Worthen, S. und Mathias, M. (1983): Prostacyclin production and lung endothelial cell shear stress. *Prog. Clin. Biol. Res.* 136, 125-131.
- Renz-Polster, H., Krautzig, S. und Braun, J. (2004): *Basislehrbuch Innere Medizin.* 3.Aufl. München: Elsevier GmbH, Urban und Fischer Verlag, 492-494.
- Resnick, N., Yahav, H., Khachigian, L.M., Collins, T., Anderson, K.R., Dewey, C.F.J. und Gimbrone, M.A.J. (1997): Endothelial gene regulation by laminar shear stress. *Adv. Exp. Med. Biol.* 430, 155-164.
- Riley, D. J., Rannels, D. E., Low, R. B., Jensen, L. und Jacobs, T. P. (1990): Effects of physical forces on lung structure, function, and metabolism. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142, 910-914.
- Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G. und Karin, M. (1998): IKK γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature.* 395, 297-300.
- Sanchez-Esteban J, Wang Y, Cicchiello LA, Rubin LP. (2002): Cyclic mechanical stretch inhibits cell proliferation and induces apoptosis in fetal rat lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 282(3), 448-56.
- Sanderson, M. J. und Dirksen, E. R. (1986): Mechanosensitivity of cultured ciliated cells from the mammalian respiratory tract: implication for the regulation of mucociliary transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 7302-7306.
- Sandoshima, J. und Izumo, S. (1997): The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 551-571.
- Savla, U., Sporn, P. H. und Waters, C. M. (1997): Cyclic stretch of airway epithelium inhibits prostanoid synthesis. *Am. J. Physiol.* 273 (Lung Cell Mol. Physiol. 17), 1013-1019.
- Savla, U., Sporn, P.H. und Waters, C.M. (1997): Cyclic stretch of airway epithelium inhibits prostanoid synthesis. *Am. J. Physiol.* 273 (Lung Cell Mol. Physiol.

- 17), 1013-1019.
- Scheidereit C. (1998): Signal transduction: Docking NF- κ B kinases. *Nature*. 395, 225-226.
- Scherer, D. C., Brockmann, J., Chen, Z., Maniatis, T. und Ballard, D. (1995): Signal-induced degradation of I κ B α requires site-specific ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92, 11259-11263.
- Scott, J. E., Yang, S.Y., Stanik, E. und Anderson, J.E. (1993): Influence of strain on (3H) thymidine incorporation, surfactant related phospholipid synthesis, and cAMP levels in fetal type II alveolar cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol*. 8, 258-265.
- Seeger, W., Walmrath, D., Grimminger, F., Rosseau, S., Schütte, H., Krämer, H.-J., Ermert, L. und Kiss, L. (1994): Adult respiratory distress syndrome: model systems using isolated perfused rabbit lungs. *Methods Enzymol*. 233, 549-584.
- Sen, CK. und Packer, L. (1996): Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J*. 10, 709-720.
- Sen, R. und Baltimore, D. (1986a): Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 46, 705-16.
- Sen, R. und Baltimore, D. (1986b): Inducibility of the immunoglobulin enhancer binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell*. 47, 921-928.
- Senftleben, U., Cao Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C. und Karin, M. (2001): Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science*. 293, 1495-1499.
- Shannon, J. M., Mason, R. J. und Jennings, S. D. (1987): Functional differentiation of alveolar type-II epithelial cells in vitro: effects of cellshape, cell matrix, and cell-cell interactions. *Biochim. Biophys. Acta*. 931, 143-156.
- Shimada, T., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Inoue, J., Tatsumi, Y., Kanamura, A. und Akira, S. (1999): IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to I κ B kinases. *Int. Immunol*. 11, 1357-1362.
- Shirley, H.H., Wolfram, C.G., Wasserman, K. und Mayerson, H.S. (2000): Capillary permeability to macromolecules: stretched pore phenomenon. *Am.J.Physiol*. 190, 189-193.

- Siebenlist, U., Franzoso, G. und Brown, K. (1994): Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu Rev Cell Biol.* 10, 405-455.
- Simeonidis, S., Stauber, D., Chen, G., Hendrickson, W.A. und Thanos, D. (1999): Mechanism by which I κ B proteins control NF- κ B activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96, 49-54.
- Simpson, L. L., Tanswell, A. K. und Joneja, M. G. (1985): Epithelial cell differentiation in organotypic cultures of fetal rat lung. *Am. J. Anat.* 172, 31-40.
- Skinner, S.J.M., Sommervell, C.E. und Olson, D.M. (1992): The effects of mechanical stretching on fetal rat lung cell prostacyclin production. *Prostaglandins.* 43, 413-433.
- Slutsky, A. S. und Ranieri, V. M. (2000): Mechanical ventilation: lessons from the ARDSNet trial. *Respir. Res.* 1, 73-77.
- Slutsky, A.S. und Tremblay, L.N. (1998): Multiple System Organ failure. Is mechanical Ventilation a Contributing Factor? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 1721-1725.
- Stancovski, I. und Baltimore, D. (1997): NF- κ B activation: The I κ B kinase revealed? *Cell.* 91, 299-302.
- Stephen, P. A., Bartolák-Suki, E., Suki, B. (2009): Variable stretch pattern enhances surfactant secretion in alveolar type II cells in culture. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296, 574-581.
- Stroh, C. (2002): Entwicklung neuer Proteintransduktionssysteme zur Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. *Naturwissenschaftliche Dissertation.* Tübingen.
- Tak, P.P. und Firestein, G.S. (2001): NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* 107, 7-11.
- Tegethoff, S., Behlke, J. und Scheidereit, C. (2003): Tetrameric oligomerization of I κ B kinase gamma (IKKgamma) is obligatory for IKK complex activity and NF κ B activation. *Mol Cell Biol.* 23, 2029-2041.
- Thanos, D. und Maniatis, T. (1995): NF- κ B: A lesson in family values. *Cell.* 80, 529-532.
- Thompson, J.E., Phillips, R.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Ghosh, S. (1995): I κ B- β regulates the persistence response in a biphasic activation of

- NF- κ B. *Cell*. 80, 573-582.
- Tran, K., Merika, M. und Thanos, D. (1997): Distinct functional properties of IkappaB alpha and IkappaB beta. *Mol Cell Biol*. 17, 5386-5399.
- Tran-Son-Tay, R. (1993): Techniques for studying the effects of physical forces on mammalian cells and measuring cell mechanical properties. In: *Physical Forces and the Mammalian Cell*, edited by J. A. Frangos. San Diego, CA: Academic, p. 1-60.
- Tremblay, L., Valenza, Ribeiro, S., Li, J. and Slutsky, A.S. (1997): Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos mRNA expression in an isolated rat lung model. *J. Clin. Invest*. 99, 944-952.
- Tschumberlin, D.J. und Margulies, S.S. (1998): Equibiaxial deformation –induced injury of alveolar epithelial cells in vitro. *Am. J. Physiol*. 275 (Lung Cell Mol. Physiol. 19), 1173-1183.
- Turner, C.H., Owan, I. und Takano, Y. (1995): Mechanotransduction in bone: role of strain rate. *Am. J. Physiol*. 269 (Endocrinol Metab, 32), 438-442.
- Uhlig, U., Drömann, D., Goldmann, T., Dombrowsky, H., Vollmer, E., Zabel, P., Uhlig S. (2006): Pulmonary responses to overventilation in late multiple organ failure. *Anesthesiology*. 105(6), 1192-200.
- Ulevitch, R.J. (1991): Recognition of bacterial endotoxin in biologic systems. *Lab. Invest*. 65, 121-122.
- van den Berg, R., Haenen, G.R., van den Berg, H. und Bast, A. (2001): Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr*. 86, Suppl 1,121-127.
- Villar, J. und Slutsky, A.S. (1989): The incidence of the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis*. 140, 814-816.
- Vlahakis, N. E., Schröder, M. A., Limper, A. H. und Hubmayr, R. D.(1999): Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro. *Am. J. Physiol*. 277 (Lung Cell Mol. Physiol. 21), 167-173.
- Von Bethmann, A.N., Brasch, F., Nusing, R., Vogt, K., Volk, H.D., Müller, K., Wendel, A. und Uhlig, S. (1998): Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 157, 263-272.
- Wang, C.-Y., Cusack, J. C., Liu, R. und Baldwin, A. S. (1999): Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis

- by inhibition of NF- κ B. *Nature Med.* 5, 412-417.
- Wang, N., Butler, J.P. und Ingber, D.E. (1993): Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260, 1124-1127.
- Weg, J.G., Anzueto, A., Balk, R.A., Wiedemann, H.P., Pattishall, E.N., Schork, M.A. und Wagner, L.A. (1998): The relation of pneumothorax and other air leaks to mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 338, 341-346.
- West, J.B., Tsukimoto, K., Mathieu-Costello, O. und Prediletto, R. (1991): Stress failure in pulmonary capillaries. *J.Appl.Physiol.* 70, 1731-1742.
- Whiteside, S.T. und Israel, A. (1997): I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol.* 8, 75-82.
- Whiteside, S.T., Epinat, J.C., Rice, N.R. und Israel, A. (1997): IkappaB epsilon, a novel member of the I κ B family, controls RelA and cRel NF- κ B activity. *EMBO J.* 16, 1413-1426.
- Winston, F. K., Macarak, E. J., Gorfien, S. F. und Thibault, L. E. (1989): A system to reproduce and quantify the biomechanical environment of the cell. *J. Appl. Physiol.* 67, 397-405.
- Wirtz, H. R. W. und Dobbs, L. G. (1990): Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical strain of lung epithelial cells. *Science.* 250, 1266-1269.
- Woronicz, J.D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M. und Goeddel, D.V. (1997): IkappaB kinase-beta: NFkappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science.* 278, 866-869.
- Wu Q., Shu H., Yao S., Xiang H. (2009): Mechanical stretch induces pentraxin 3 release by alveolar epithelial cells in vitro. *Med Sci Monit.* 15(5), 135-140.
- Wyncoll, L.A.D. und Evans, T.W. (1999): Acute respiratory distress syndrome. *Lancet.* 354, 497-501.
- Xu, J., Liu, M., Tanswell, A.K. und Post, M. (1998): Mesenchymal determination of mechanical strain- induced fetal lung cell proliferation. *Am. J. Physiol.* 275 (Lung Cell Mol. Physiol. 19), 545-550.
- Yaron, A., Hatzubai, A., Davis, M., Lavon, I., Amit, S., Manning, A. M., Andersen, J. S., Mann, M., Mercurio, F. und Ben-Neriah, Y. (1998): Identification of the receptor component of the I κ B α -ubiquitin ligase. *Nature.* 396, 590-594.

- Zabel, U. und Baeuerle, P. A. (1990): Purified human I κ B can rapidly dissociate the complex of the NF- κ B transcription factor with its cognate DNA. *Cell*. 61, 255-265.
- Zandi, E. und Karin, M. (1999): Bridging the gap: Composition, regulation and physiological function of the I κ B kinase complex. *Mol Cell Biol*. 19:4547-4551.
- Zandi, E., Rotwarf, D.M., Delhase, M. und Karin, M. (1997): The I κ B kinase komplex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell*. 91, 243-252.

8 Abkürzungsverzeichnis

Einige Abkürzungen werden nachfolgend aufgeführt:

Ak	Antikörper
CaCl ₂	Calciumchlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)- tetraessigsäure
FKS	fetales Kälberserum
HCl	Hydrogenchlorid = Chlorwasserstoff
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- Ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
KCl	Kaliumchlorid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Na ₃ VO ₄	Trinatriumvanadat trihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
nE	nukleäre Extrakte
NLP	Nukleärer Lysis Puffer
P1 / 2	Puffer 1 / 2
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phos- phate buffered saline)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkul- turmedium dort entwickelt)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan =

	Trometamol
Tween 20	Polysorbate 20 = Polyoxyethylen(20)- sorbitan-monolaurat
zE	zytosolische Extrakte
ZLP	Zytosolischer Lysis Puffer

9 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 NF- κ B/Rel- und I κ B-Proteine
verändert nach: Karin, M. und Ben-Neriah, Y. (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Ann. Rev. Immunol.* 18, 621-663.
aus: Stroh, C. (2002): Entwicklung neuer Proteintransduktionssysteme zur Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Naturwissenschaftliche Dissertation. Tübingen.
- Abb. 2 Allgemeiner Aktivierungsmechanismus von NF- κ B
Stroh, C. (2002): Entwicklung neuer Proteintransduktionssysteme zur Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Naturwissenschaftliche Dissertation. Tübingen.
- Abb. 3 Der IKK-Komplex als zentrale Schaltstelle der NF- κ B-Aktivierung.
Baumgartner, B. (2005): Dysregulation des NF- κ B-Systems bei akuter myeloischer Leukämie. Medizinische Doktorarbeit. München.
- Abb. 4 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der isolierten Tierlunge
Eisenhardt, N.A. (2005): Selektive Hemmung der Aktivität des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor-kappa B im Modell der isolierten Rattenlunge nach Stimulation mit bakteriellem Endotoxin. Medizinische Doktorarbeit. Gießen.
- Abb. 5 Schematische Darstellungen der Geräte, die zur mechanischen in vitro Stimulation von Zellen benötigt werden
Aslan-Akineden, S. (2006): Inflammatorisches Verhalten von Typ-II Zellen unter mechanischer Belastung (Zell stretch in vitro). Medizinische Doktorarbeit. Gießen.
- Abb. 6 Flexercell® Tension Plus™ System (FX-3000™)
- Abb. 7 grafische Darstellung der Dehnampplitude und –frequenz
- Abb. 8 Mittelwerte der LDH – Konzentration bei einer physiologischen 20-15 Dehnung
- Abb. 9 Mittelwerte der LDH – Konzentration bei einer pathologische 40-30 Dehnung
- Abb. 10 Mittelwerte der NF- κ B Konzentrationen in den cytosolischen Extrakten bei einer 20-15 Dehnung
- Abb. 11 Mittelwerte der NF- κ B Konzentrationen in den cytosolischen Extrakten bei einer 40-30 Dehnung
- Abb. 12 Mittelwerte der NF- κ B Konzentrationen in den nukleären Extrakten bei einer 20-15 Dehnung
- Abb. 13 Mittelwerte der NF- κ B Konzentrationen in den nukleären Extrakten bei einer 40-30 Dehnung

- Abb. 14 Mittelwerte (n=3) der NF- κ B Konz. der ATII-Zellen im zeitlichen Dehnungsverlauf (40-30) bei 0h, 1h, 2h, 4h und 24h
- Abb. 15 Mittelwerte (n=3) der NF- κ B Konz. der A549 - Zellen im zeitlichen Dehnungsverlauf (40-30) bei 0h, 1h, 2h, 4h und 24h
- Abb. 16 Mittelwerte (n=3) der NF- κ B Konz. der Wi38 - Zellen im zeitlichen Dehnungsverlauf (40-30) bei 0h, 1h, 2h, 4h und 24h

10 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

09.09.2009

Datum

gez. Franziska Maser

Unterschrift

11 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen bedanken, ohne deren Hilfe und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. H. Wirtz für die Aufnahme als Doktorandin und die interessante Aufgabenstellung.

Ich bedanke mich weiterhin sehr bei meinen Betreuern Dr. rer. nat. H. Kuhn für die vielen Ratschläge und die große Unterstützung im Pulmolabor sowie Dr. med. habil. S. Hammerschmidt für die ausführliche Beantwortung und Hilfe in allen medizinisch fachlichen Belangen.

Vielen lieben Dank sage ich auch Frau Konstanze Büttner für die Einarbeitung in die Zellisolierungstechniken und ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft sowie Geduld im Labor.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester für ihren starken Rückhalt und ihre grenzenlose Unterstützung.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Franziska Maser
Geburtsdatum:	02. Dezember 1982
Geburtsort:	Quedlinburg
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch

Schul Ausbildung

1989 - 1993	Grundschule „Am Heinrichsplatz“, Quedlinburg
1993 - 2002	Dorothea-Erxleben-Gymnasium, Quedlinburg, 15.06.2002 Abschluss der allgemeinen Hochschulrei- fe (Abitur)

Hochschulausbildung

01.10.2002 - 11.11.2008	Universität Leipzig, Studentin der Humanmedizin
02.09.2004	Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung (alte ÄAppO)
11.11.2008	Bestehen der Ärztlichen Prüfung und Abschluss des Medizinstudiums an der Universität Leipzig (neue ÄAppO)
04.12.2008	Erteilung der Approbation als Ärztin
12.11.2008 – 31.03.2009	Universität Leipzig, Promotionsstudentin an der Medi- zinischen Fakultät

Beruflicher Werdegang

seit 01.04.2009	Assistensärztin in Weiterbildung in der Klinik und Po- liklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde an der Medizinischen Hochschule Hannover bei Herrn Prof. Dr. med. Th. Lenarz
-----------------	--

Promotion

seit 09. Mai 2005	Thema: „Die Rolle von NFkB bei der mechanischen Belastung von Lungenzellen“, Universitätsklinikum Leipzig, Medizinische Klinik und Poliklinik I, Abteilung für Pneumologie,
-------------------	--

04.09.2006	Klinikdirektor und Doktorvater: Prof. Dr. med. H. Wirtz, Betreuer: Dr. rer. nat. H. Kuhn
15.04.2007	Posterpräsentation auf dem ERS Kongress München Posterpräsentation auf dem DGIM Kongress Wiesbaden
Fakultative Lehrveranstaltungen	
17.12.2003	Zertifikat: „Einführung in hausärztliche Arbeitstechniken in der Allgemeinmedizin“, Universität Leipzig, Medizinische Fakultät, Selbständige Abteilung Allgemeinmedizin
Januar 2005	Zertifikat: „Impfkurs für Studenten der Medizin in den klinischen Semestern“, Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen (LUA)
Besondere Kenntnisse	
Fremdsprachen:	Englisch: gute Kenntnisse, zusätzlicher Abschluss am 29.04.2004: „Leipziger Fachsprachenzertifikat Englisch, UNIcert® - Stufe III / C 1“, Universität Leipzig, Fremdsprachenzentrum Französisch und Spanisch: Schulkenntnisse
Persönliche Interessen	
1993 - 2001	Musikschule „Johann Heinrich Rolle“ Quedlinburg, 22.06.2001 Mittelstufenabschluss im Fach Querflöte
1993 - 1995 und 2001 - 2002	Kabarettgruppe des Dorothea-Erxleben-Gymnasiums, Quedlinburg